6 KARTON ? L: 040405
F 1330

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 28

1985

IANUARIE — IUNIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 28, nr. 1, p. 1—100, 1985, Bucureşti

SCBIAS 28 (1), 1985

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de două ori pe an.
În țară, abonamentele se primesc la oficiile poștale.
Cititorii din străinătate se pot abona prin ROMPRESFILATELIA, sectorul export-import presă, P. O. Box 12—201, telex 10 376, prsfi r, 78104 — București, R. S. România, Calea Griviței nr. 64—66.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie", București, P.O. Box 2—2, 78200 — București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 79717

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

TOMUL 28, NR. 1 1985

IANUARIE—IUNIE

MŰSZAKI INFORMÁCIÓS EGYESÜLET KÖNYVTÁRA 1883 BUDAPEST

SUMAR

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, E. BORDAŞ, Interacţiunea arsenului şi plumbului cu metabolismul glucozei şi activitatea colinesterazei din creierul de şobolan 3

RODICA BÎRNESCU, ELENA GANEA, Activitatea amilolitică a preparatelor NGF din glandele submaxilare de şoarece 9

MARIA CIUGUDEANU, SILVIA GABOR, Efectul selenitului de sodiu asupra sistemului celular de apărare antioxidativă 14

MARIA CIUGUDEANU, SILVIA GABOR, Efectul toxic al diferitelor doze de cadmiu asupra sistemului antioxidativ din rinichi şi ficat 18

I. F. DUMITRU, V. CIALÂCU, V. DIMA, MIOARA MANCIULEA, DANA IORDĂCHESCU, Dinamica imunoglobulinelor din ileumul cobailor imunizaţi cu vaccinuri ribozomale bacteriene 23

Z. GÂRBAN, ŞT. HOLBAN, MARIA BRAZDĂ, D. CIUBOTARIU, G. VĂCĂRESCU, Unele probleme de patologie moleculară în carcinogeneza chimică I. Interacţiunea acidului deoxiribonucleic cu compuşi policiclici 31

IOANA HAGIMA, Focalizarea izoelectrică fără amfoliţi a unor componente proteice şi enzimatice din seminţe de *Aegilops* sp. şi *Triticum* sp. 41

RADU OLINESCU, RUXANDRA ALEXANDRESCU, STELA NIŢĂ, Studiul utilizării luminolului ca donor de electroni pentru determinarea activităţii peroxidazei . . 46

RADU OLINESCU, NORA PASCU, STELA NIŢĂ, PAULA POPA, Modificarea interacţiunii medicament — receptor dopaminergic din creier în urma iradierii „in vivo" 54

T. POPESCU, LILIANA PÂSLARU, ROXANA VASILCO, TATIANA ONISEI, SORIN COMOROŞAN, Interacţiunea dintre cîmpul electromagnetic de înaltă frecvenţă şi activitatea lactatdehidrogenazei 60

CRISTINA TĂNASE, Reacţia dintre fragmentele Fab şi Fc izolate din anticorpii antialbumină şi albumina umană polimerizată cu glutaraldehidă 68

REFERAT GENERAL

DOINA POPOV, Proteoglicanii şi glicozaminoglicanii membranari şi rolul lor în interacţiunile celulare 76

IN MEMORIAM

MIOARA CÂRSTEANU (1930–1984) 88

RECENZII 92

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

TOME 28, No. 1 1985

JANUARY—JUNE

CONTENTS

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, E. BORDAŞ, Arsenic and lead interaction with glucose metabolism and acetylcholinesterase activity in the rat brain 3

RODICA BÎRNESCU, ELENA GANEA, Amylolytic activity of NGF fractions from mouse submaxillary glands 9

MARIA CIUGUDEANU, SILVIA GABOR, The effect of sodium selenite on the cellular antioxidative defense system 14

MARIA CIUGUDEANU, SILVIA GABOR, The effect of cadmium on the cellular antioxidative defense system 18

I. F. DUMITRU, V. CIALÂCU, V. DIMA, MIOARA MANCIULEA, DANA IORDĂCHESCU, Dynamics of Ig in guinea pig ileum immunized with bacterial ribosomal vaccines 23

Z. GÂRBAN, ŞT. HOLBAN, MARIA BRAZDĂ, D. CIUBOTARIU, G. VĂCĂRESCU, Some problems of molecular pathology in chemical carcinogenesis. I. Interaction of deoxyribonucleic acid with polycyclic compounds 31

IOANA HAGIMA, The isoelectric focusing without ampholyte of some proteic and enzymic components from *Aegilops* sp. and *Triticum* sp. seeds 41

RADU OLINESCU, RUXANDRA ALEXANDRESCU, STELA NIŢĂ, Utilization of luminol as an electron donor for the measurement of peroxidase activity 46

RADU OLINESCU, NORA PASCU, STELA NIŢĂ, PAULA POPA, Modification of the drug — dopaminergic receptor interaction in the brain following the "in vivo" irradiation 54

T. POPESCU, LILIANA PÂSLARU, ROXANA VASILCO, TATIANA ONISEI, SORIN COMOROŞAN, Interaction of the high frequency electromagnetic field with lactate dehydrogenase activity 60

CRISTINA TĂNASE, The reaction of Fab and Fc fragments isolated from antialbumin antibodies and human albumin polymerised with glutaraldehyde 68

GENERAL REVIEW

DOINA POPOV, Membranal proteoglycans and glycose aminoglycans and their role in cell interactions 76

IN MEMORIAM

MIOARA CÂRSTEANU (1930—1984) 88

REVIEWS 92

INTERACȚIUNEA ARSENULUI ȘI PLUMBULUI CU METABOLISMUL GLUCOZEI ȘI ACTIVITATEA COLINESTERAZEI DIN CREIERUL DE ȘOBOLAN

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, E. BORDAȘ

Rezumat. Șobolani femele care alăptează au primit zilnic arsen 1 % (arsenit), administrat singur și în combinație cu 1 % plumb (acetat) în apa de băut timp de 45 de zile.
S-au determinat glucoza și colinesteraza din sînge, hexokinaza, lipoperoxizii și activitatea colinesterazei din creierul șobolanilor pui.
Rezultatele obținute au arătat o creștere a glucozei din sînge, a hexokinazei și a lipoperoxizilor în toate zonele din creier studiate și o scădere a activității colinesterazei în sînge și cerebel la șobolanii tratați cu arsen.
Administrarea simultană de arsen și plumb nu a indus efecte toxice aditive la nivelul parametrilor biochimici investigați.

Expunerea cronică la concentrații scăzute de diferite metale (Pb, Cd, As, Mn) prezente în mediul înconjurător sau la locul de muncă poate constitui un factor etiologic important al diferitelor disfuncții metabolice ale sistemului nervos central și periferic la animale și la om (1), (2).

Intensitatea și caracterul afectării neurologice depind de metalul respectiv, de vîrstă, de specie, de calea de pătrundere în organism, de starea nutrițională etc. (3), (4).

Se subliniază astfel sensibilitatea crescută a creierului animalelor tinere față de acțiunea toxică a Pb, Cd, As, Mn (5), (6), (7), (8), sensibilitate dată de incompleta dezvoltare a barierei hematoencefalice, de procesele energometabolice, de excreție etc. (9).

În ceea ce privește efectele neurochimice, se presupune că acțiunea toxică a diferitelor metale la nivelul metabolismului cerebral s-ar datora interacțiunii acestora cu grupările SH ale diferitelor enzime și dislocări de ioni metalici biologic activi din metaloenzime (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16).

Cunoscut fiind rolul major al glucozei în furnizarea de energie și de grupare acetil, necesară în sinteza acetilcolinei (17), (18), se poate presupune că o interacțiune a Pb și As cu metabolismul glucozei și sinteza acetilcolinei ar sta la baza mecanismelor de acțiune neurotoxică a acestor două metale.

Este cunoscut că, atît în condiții de poluare a mediului înconjurător, cît și în condiții de expunere profesională, organismul vine în contact simultan cu o multitudine de factori, fapt ce ne-a determinat ca în lucrarea prezentă să studiem acțiunea arsenului, administrat separat și în combinație cu plumbul, asupra unor indicatori biochimici din sînge și din creierul de șobolan imatur.

MATERIAL ȘI METODE

Experimentul s-a efectuat pe pui de șobolan care au fost intoxicați cu arsen și arsen + plumb prin laptele de mamă, procedeu inițiat de Pentschiew și Garro pentru plumb (19).

S-au folosit trei loturi de animale : 1) șobolani pui ale căror mame au primit arsen (arsenit de sodiu) în apa de băut, în concentrație de 1 %, începînd din prima zi de la naștere, timp de cinci

săptămîni ; 2) şobolani pui ale căror mame au primit arsen (arsenit) 1 % şi plumb (acetat) 1 % în proporţie de 1 : 1 în apa de băut, zilnic, timp de cinci săptămîni ; 3) şobolani pui ale căror mame au primit, prin acelaşi procedeu, apă de robinet, animale care au servit drept lot martor.

Ca indicatori biotoxicologici s-au determinat greutatea corporală, greutatea umedă şi uscată a creierului şi examenul anatomopatologic al creierului.

Sacrificarea animalelor s-a făcut prin decapitare, recoltîndu-se sînge pentru determinarea glicemiei (20) şi a activităţii acetilcolinesterazei (21). Creierul a fost rapid prelevat şi pregătit la rece în vederea următoarelor determinări : activitatea hexokinazică (22), ca indicator al gradului de metabolizare al glucozei de către creier, activitatea acetilcolinesterazică (22), ca indicator al funcţiei de neurotransmisie colinergică şi activitatea lipoperoxidazică din creier (23), ca indicator al integrităţii membranare.

S-a lucrat pe omogenat de creier, care a fost suspendat în soluţie tampon fosfat, pH=7,4, folosindu-se un omogenat 10 % pentru determinarea hexokinazei şi a lipoperoxizilor şi 5 % pentru determinarea colinesterazei.

Rezultatele obţinute au fost prelucrate statistic, folosindu-se media aritmetică ($\bar{x}$), abaterea standard (σ), testul de probabilitate (p) şi modificările procentuale faţă de martor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Greutatea corporală a puilor de şobolan intoxicaţi cu arsen a prezentat o scădere semnificativă statistic comparativ cu lotul de animale martor (fig. 1).

Animalele tratate simultan cu As + Pb nu au prezentat modificări comparativ cu lotul martor.

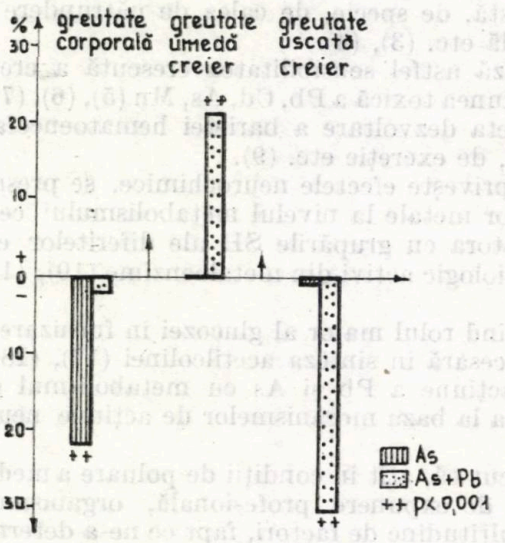


Fig. 1. — Indicatori morfologici (greutate corporală, greutate umedă şi uscată a creierului).

Scăderea în greutate a şobolanilor pui intoxicaţi cu arsen s-ar putea datora unei insuficiente furnizări de lapte de către mamele puilor sau efectului toxic direct al arsenului asupra dezvoltării puilor.

Greutatea umedă şi uscată a creierului animalelor tratate numai cu arsen nu a fost modificată comparativ cu animalele martor. Animalele tratate simultan cu As + Pb au prezentat o creştere semnificativă statistic a greutăţii relative umede şi o scădere a greutăţii relative uscate a creieru-

lui comparativ cu lotul de animale martor și cel tratat numai cu arsen (fig. 1).

Examenul histopatologic al creierului animalelor intoxicate cu arsen a evidențiat hemoragii perivasculare fără modificări edematoase.

Animalele intoxicate simultan cu As + Pb au prezentat la examenul histopatologic modificări vasculare însoțite de creșterea permeabilității

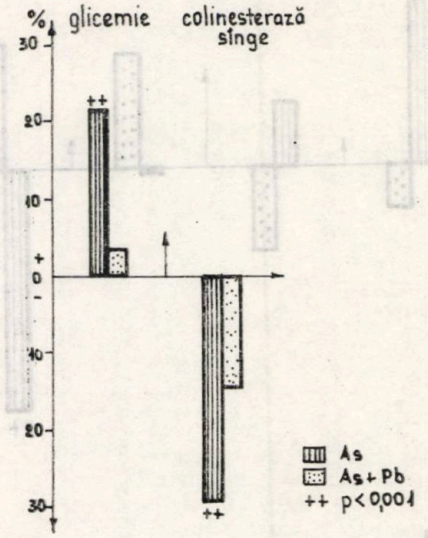


Fig. 2. — Indicatori biochimici din sînge (glicemie, activitate colinesterazică).

capilare, fapt ce duce la apariția edemului cerebral, proces caracteristic în encefalopatia saturniană (24). Aceste date ar explica în parte creșterea greutății relative umede, evidențiate de noi la șobolani intoxicați simultan cu As + Pb (edem cerebral, provocat de plumb).

Ca indicatori biochimici în sînge (fig. 2), glicemia a fost crescută semnificativ la animalele tratate numai cu arsen, fapt care pledează pentru afectarea hemeostaziei glucozei, evidențiată de noi și la șobolani maturi intoxicați cu arsen prin apa de băut (25). Administrarea simultană de As + Pb nu a modificat semnificativ glicemia comparativ cu animalele martor.

Activitatea acetilcolinesterazei din sînge (fig. 2) a fost scăzută la ambele loturi de animale intoxicate, cu semnificație statistică însă numai pentru lotul de animale intoxicate cu arsen.

Printre indicatorii biochimici din creier (fig. 3), activitatea hexokinazei din creierul de șobolani intoxicați cu arsen a prezentat creșteri semnificative în toate zonele din creier studiate, cu semnificație statistică pentru emisferele cerebrale și cerebel. Creșterea activității acestei enzime evidențiază o intensificare a consumului de glucoză de către creier. Datele din literatură arată că metabolismul energetic în general este mai rapid în prezența arsenului, dar mai puțin efectiv și cu un caracter mai anaerobiotic (26). Administrarea simultană de As + Pb nu a modificat semnificativ activitatea acestei enzime comparativ cu lotul de animale martor. Comparativ cu lotul de animale tratate numai cu arsen, plumbul pare să acționeze antagonist cu arsenul.

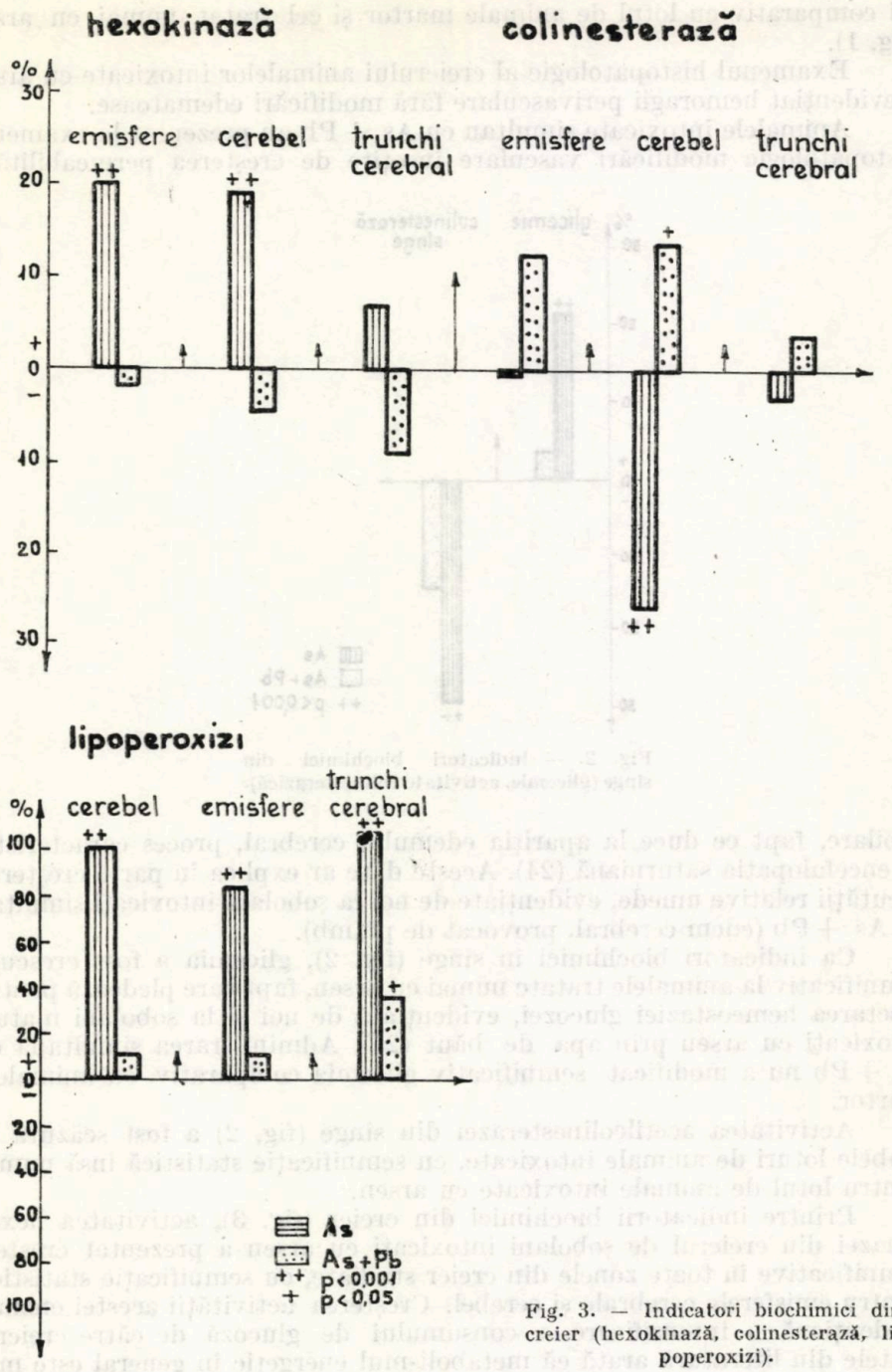


Fig. 3. — Indicatori biochimici din creier (hexokinază, colinesterază, lipoperoxizi).

Activitatea acetilcolinesterazei din creier (fig. 3) a prezentat o scădere semnificativă în cerebel în cazul animalelor care au primit numai arsen și o creștere la animalele tratate cu As+Pb, plumbul manifestînd efecte antagoniste față de arsen.

Activitatea lipoperoxidazică în diferite zone ale creierului la șobolanii intoxicați cu arsen a prezentat creșteri semnificative statistic în toate zonele din creier studiate, indicînd o afectare a integrității membranare. După unii autori (27), acțiunea diferitelor metale la nivel de membrană ar avea la bază interacțiunea acestora cu grupările SH și cu lipidele din stratele lipoproteice membranare sau dislocarea diferitelor bioelemente, ca Cu, Ca, Zn etc.

CONCLUZII

1. Administrarea de arsen (arsenit) la puii de șobolan prin laptele de mamă afectează semnificativ hemeostazia glucozei (hiperglicemie), intensifică consumul de glucoză al creierului (activitate hexokinazică crescută), afectează integritatea membranară (creștere a activității lipoperoxidazice) și sistemul de neurotransmisie colinergic periferic și central (scădere a activității acetilcolinesterazei din sînge și creier).

2. Administrarea simultană de arsen și plumb nu duce la efecte aditive la nivelul parametrilor biochimici urmăriți, plumbul manifestînd efecte antagoniste față de arsen (scădere a activității neurotoxice a arsenului).

3. Se poate presupune că la baza efectelor neurotoxice ale arsenului ar sta interacțiunea sa cu metabolismul energetic al creierului și cu funcția de neurotransmisie colinergică.

Prezentat la redacție
la 30 august 1984

Institutul de igienă și sănătate publică
Cluj-Napoca, str. Pasteur nr. 6

ARSENIC AND LEAD INTERACTION WITH GLUCOSE METABOLISM AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE RAT BRAIN

Summary

Lactating female rats received daily in drinking water 1% arsenic (arsenite) solely and in combination with 1% lead (acetate), for 45 days.

Blood glucose and cholinesterase activity, hexokinase, lipid peroxidation and cholinesterase in the brain were determined in offspring rats.

The obtained results showed an increase of blood glucose, hexokinase and lipid peroxidation in all areas of the brain and a decrease of cholinesterase activity in the blood and cerebellum in arsenic treated rats.

The simultaneous administration of arsenic and lead did not induce additive toxic effects on the parameters investigated.

BIBLIOGRAFIE

1. L. HEILMEYER, *Fiziopatologie specială*, Edit. medicală , București, 1980, p. 866.
2. U. EWERS, R. ERBE, Toxicology, **16**, 227 (1980).
3. J. D. REPKO, C. R. CORUM, Crit. Rev. Toxicol., **6**, 135 (1979).
4. J. A. MICHAELSON, M. W. SAUERHOFF, Environm. Health Perspect., **7**, 201 (1974).
5. KING-LIT, CURTIS D. KLAASSON, Toxicology and Pharmacology, **63**, 330 (1982).

6. M. DAS, R. DIXIT, P. K. SETH, H. MUKHAM, J. Neurochem., **36**, *4*, 1439 (1981).
7. D. H. TAYLOR, E. A. NOLAND, C. M. BRUBAKER, K. M. CROFTON, Neurobehav. Toxicol. Teratol., **4**, 313(1982).
8. Z. ANCA, S. GABOR, St. cerc. biochim., **27**, *1*, 3 (1984).
9. H. WIEGAND, Umwelthygiene, Jahresberichte, **12**, 59(1979).
10. E. CRISTEA, A. POPESCU, M. ZAMFIRESCU-GHEORGHIU, *Biochimie medicală*, Edit. medicală, Bucureşti, 1980, p. 631.
11. D. HOLTZMAN, A. S. HSU, P. MORTELE, Neurochem. Res., **3**, 195 (1978).
12. A. M. SCHENHAMMER, M. G. CHERIAN, Toxicol. Appl. Pharmacol., **61**, 233 (1981).
13. D. V. FROST, Fed. Proc., **26**, 194(1967).
14. S. NOVICOVA, Gig. Sanit., **34**, 81(1969).
15. P. MANU, *Medicina muncii*, Edit. medicală, Bucureşti, 1983, p. 260.
16. D. E. GMEREK, M. R. McCAFFERTY, J. Neurochem., **36**, 1109 (1981).
17. G. E. GIBSON, J. P. BLASS, J. Neurochem., **26**, 1075 (1976).
18. C. H. STERLING, K. J. O'NEIL, M. R. McCAFFERTY, J. J. O'NEIL, J. Neurochem., **39**, *2*, 593(1982).
19. A. PENTSCHIEW, F. GARRO, Acta Neuropath., **6**, 266(1966).
20. S. D. HUGGET, D. A. NIXON, Lancet, *2683*, 273(1957).
21. R. TRUHAUST, H. VERAIN, Ann. Biol. Chim., **22**, *3—4*, 414(1964).
22. B. KOHN, R. H. MIRSKY, Science, **106**, 148(1947).
23. E. D. WILLS, Biochim. Biophys. Acta, **84**, 475(1964).
24. C. ARSENI, *Tratat de neurologie*, vol. 3, partea a 3-a, Edit. medicală Bucureşti, 1981, p. 954.
25. Z. ANCA, S. GABOR, St. cerc. biochim., **24**, 127(1981).
26. D. V. FROST, Fed. Proc., **26**, 194 (1967).
27. K. MAKAGAWY, M. ASAMI, K. KURGAMA, Toxicol. Appl. Pharmacol., **56**, 86(1980).

ACTIVITATEA AMILOLITICĂ A PREPARATELOR NGF DIN GLANDELE SUBMAXILARE DE ŞOARECE

RODICA BÎRNESCU, ELENA GANEA

Rezumat. S-a evidenţiat activitatea amilazică în omogenatul total de glande submaxilare de şoarece şi în fracţiunile proteice obţinute la separarea acestuia prin gel-filtrare pe Sephadex G—100 şi cromatografie pe DEAE-celuloză, etape de purificare a NGF. În acest scop s-au folosit comparativ trei metode de determinare a activităţii amilazice : metoda Schill şi Schumacher, metoda „sandwich" şi metoda „prin imersie". În cadrul metodei Schill şi Schumacher s-a urmărit influenţa următorilor factori asupra activităţii amilazice : concentraţia şi pH-ul tamponului de incubare şi efectele ionilor de Cu^{2+}. Rezultatele au arătat prezenţa activităţii amilazice, alături de NGF, atît în omogenatul total cît şi în toate piscurile de la gel-filtrarea pe Sephadex G—100. În etapa ulterioară de purificare a NGF, activitatea amilazică este slab evidenţiată, în piscul II DEAE-celuloză, care conţine NGF, fiind absentă.

Glandele submaxilare de şoarece mascul adult reprezintă una dintre cele mai bogate surse de factor de creştere a nervului (NGF), sursă pe care am utilizat-o şi noi în lucrări anterioare (1), (2) pentru izolarea şi caracterizarea NGF. Prezenţa activităţii amilazice în glandele submaxilare ale diferitelor mamifere este un fapt bine cunoscut, dar datele biochimice se referă în special la enzimele umane (3) şi de şobolan (4), celor de şoarece acordîndu-li-se mai puţină atenţie. Recent, Amerongen şi colab. (5) au realizat un studiu asupra proprietăţilor biochimice şi imunochimice ale α-amilazei din glandele submaxilare, parotide, sublinguale şi ale enzimei din pancreasul şi serul de şoarece. Autorii au găsit că α-amilaza submaxilară diferă imunochimic de toate celelalte amilaze, cu excepţia celei sublinguale. Locul special pe care îl ocupă enzima din glandele submaxilare de şoarece printre amilazele de alte origini ne-a determinat să studiem anumite aspecte biochimice neelucidate încă, alegînd în acelaşi timp şi metoda optimă de evidenţiere a activităţii. În plus, posibilitatea impurificării preparatului de NGF cu această enzimă ne-a impus urmărirea activităţii amilolitice în fiecare din etapele de purificare, pînă la obţinerea produsului final de NGF.

MATERIAL ŞI METODE

Prepararea şi purificarea extractului de glande submaxilare. Glandele submaxilare disecate de la şoareci adulţi masculi (Swiss albino) au fost omogenizate în tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4 (1/5 g/v), la rece şi centrifugate 30 min la 50 000 g. Supernatantul a fost prelucrat pentru obţinerea factorului de creştere a nervului după metoda lui Varon şi colab. (6), adaptată şi modificată de Ganea şi colab. (1). Fracţiunile proteice obţinute la gel-filtrare pe Sephadex G—100 şi la cromatografie pe DEAE-celuloză au fot testate pentru activitate amilazică.

Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă s-a realizat după Davis (7). După migrarea electroforetică s-au evidenţiat în paralel atît fracţiunile proteice, prin colorare cu Amidoblack 1 % în acid acetic, cît şi activitatea amilolitică. În acest scop, discurile de poliacrilamidă au fost imersate în soluţie de amidon 1 %, 24 de ore, la 37°C, după care s-au colorat cu soluţie de iod 0,1 N (Reactivul — Bucureşti), timp de 3 min la temperatura camerei.

Metode de determinare a activităţii amilazice. Activitatea amilolitică s-a evidenţiat prin difuzia radială în gel de agar-amidon după metoda lui Schill şi Schumacher (8), în tampon fosfat 0,1 M şi 0,4 M, pH 7, şi în tampon citrat 0,1 M, pH 4,8.

Comparativ s-au utilizat metoda „sandwich" şi metoda „prin imersie" în soluţie de amidon 1 %, după Clausen (9). După colorarea plăcilor cu o soluţie de iod 0,1 N, s-a măsurat diametrul zonelor luminoase contrastînd cu fondul albastru închis datorat complexului iod-amidon. Acţiunea efectorilor a fost urmărită prin metodele menţionate, utilizîndu-se ca inhibitor $CuSO_4$ 1 mM, adăugat pe placa de agar-amidon înainte de aplicarea probelor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Supernatantul obţinut prin centrifugarea omogenatului de glande submaxilare, supus electroforezei în gel de poliacrilamidă, în mediu alcalin prezintă numeroase benzi proteice (fig. 1 a), activitatea amilolitică aparţinînd fracţiunilor de migrare catodică (fig. 1 b). Localizarea factorului de creştere a nervului este, după cum arătam într-o lucrare anterioară (1), aproximativ în aceeaşi zonă.

Prezenţa mai multor benzi proteice în zona cu activitate amilazică se poate datora atît unor izoenzime amilazice, cît şi interferenţei altor proteine din supernatant. Amerongen şi colab. (5) demonstrează în supernatantul de glande parotide prezenţa unor benzi proteice majore şi a trei benzi minore, toate avînd activitate amilazică. Pentru preparatele din glandele submaxilare, autorii nu prezintă electroforegrama, menţionînd numai că obţin o bandă proteică difuză cu o activitate amilazică slabă.

Omogenatul de glande submaxilare a fost purificat în vederea obţinerii NGF prin gel-filtrare pe Sephadex G—100 şi cromatografie pe DEAE-celuloză, după cum am arătat într-o lucrare anterioară (1). Evidenţierea activităţii amilolitice în fiecare din preparatele rezultate s-a efectuat prin trei metode: metoda Schill şi Schumacher (8), metoda „sandwich" şi metoda „prin imersie" (9), în scopul stabilirii condiţiilor optime de lucru, adecvate sursei enzimatice.

Toate aceste metode au la bază acelaşi principiu, difuzia radială a soluţiilor enzimatice în gel; ceea ce diferă este contactul enzimei cu substratul. Astfel, amidonul folosit ca substrat a fost înglobat în gelul de agar (metoda Schill şi Schumacher) şi depus sub formă de film pe o plăcuţă separată, aplicată ulterior pe plăcuţa de agar în care au difuzat probele (metoda „sandwich"), iar în metoda „prin imersie" s-a introdus plăcuţa de agar conţinînd probele enzimatice într-o soluţie tamponată de amidon. Rezultatele obţinute prin metoda Schill şi Schumacher, comparativ cu cele obţinute prin metoda „sandwich", sînt prezentate în figura 2. Se observă valori superioare ale diametrelor inelelor de difuzie, evidenţiate prin metoda Schill şi Schumacher faţă de metoda „sandwich", păstrîndu-se un paralelism între cele două şiruri de valori, în cazul fracţiunilor separate prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 (fig. 2 a). La probele obţinute în etapa de purificare ulterioară, acest paralelism nu se mai păstrează decît în ultima parte a separării (fig. 2 b). Metoda „sandwich" prezintă avantajul rapidităţii (30—60 min de incubare), al economiei de substrat şi poate fi utilizată pentru determinări orientative, rapide, în timp ce cealaltă metodă, avînd o sensibilitate şi o exactitate mai mari, cu toate că timpul de incubare este mai lung (24 ore), se recomandă pentru estimări mai precise.

Metoda „prin imersie" este de asemenea o metodă economică, soluţia de amidon în care se imersează plăcuţa de agar putînd fi refolosită. Rezultatele obţinute prin această metodă sînt ilustrate în figura 3, comparativ cu metoda Schill şi Schumacher (fig. 4).

Pe ambele plăcuţe au fost aplicate aceleaşi probe, în aceeaşi ordine şi cu aceeaşi concentraţie proteică (20 μg/ml). Se observă zone de difuzie mai mari şi mai difuze în figura 3 şi zone mai bine conturate în figura 4. Activitatea amilolitică este prezentă la aceleaşi probe prin ambele metode, zona cea mai intensă şi cu diametrul cel mai mare fiind cea corespunzătoare supernatantului de la omogenatul total de glande submaxilare. Totuşi, în figura 3 apare mai pronunţată zona datorată activităţii amilazice a

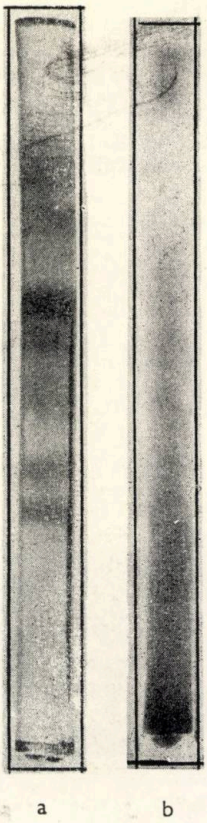


Fig. 1. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă, în mediu alcalin, a supernatantului de la omogenatul total de glande submaxilare de șoareci : *a*, colorație pentru proteine ; *b*, activitate amilazică.

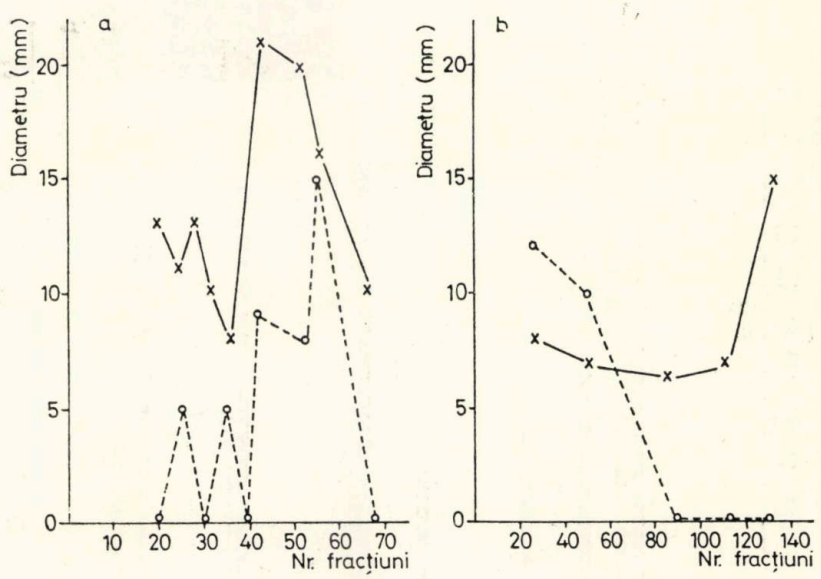


Fig. 2. — Activitatea amilazică, urmărită comparativ prin metoda Schill și Schumacher (—x—x—) și metoda „sandwich" (———0———0———), în fracțiunile proteice separate pe : *a*, Sephadex G—100 ; *b*, DEAE-celuloză.

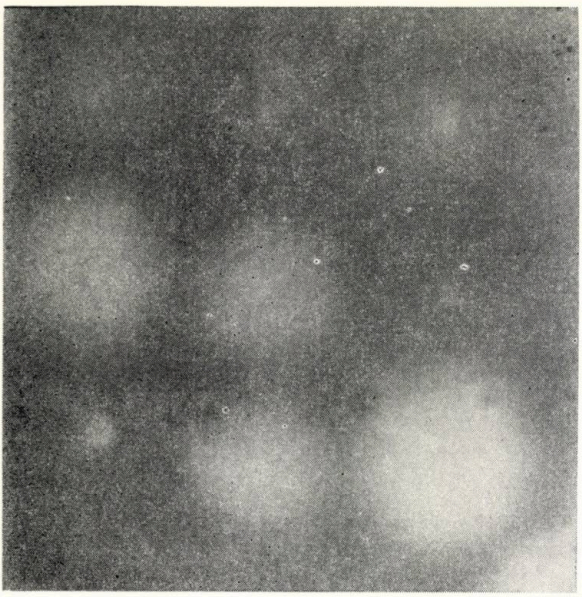


Fig. 3. — Evidenţierea activităţii amilazice prin difuzie radială în gel de agar (metoda „prin imersie") în tampon fosfat 0,1 M, pH 7, a fracţiunilor (de la stînga la dreapta şi de sus în jos) : Sephadex G—100 piscul I ascendent, I descendent, II ascendent, II, III; DEAE-celuloză piscurile I, II, III; supernatantul total.

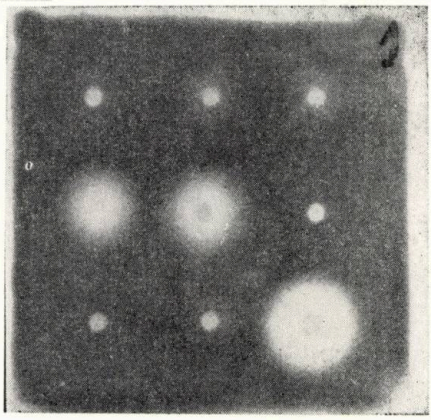


Fig. 4. — Evidenţierea activităţii amilazice prin difuzie radială în gel de agar-amidon (metoda Schill şi Schumacher) cu tampon fosfat 0,1 M, pH 7, a fracţiunilor din figura 3 (aceeaşi ordine).

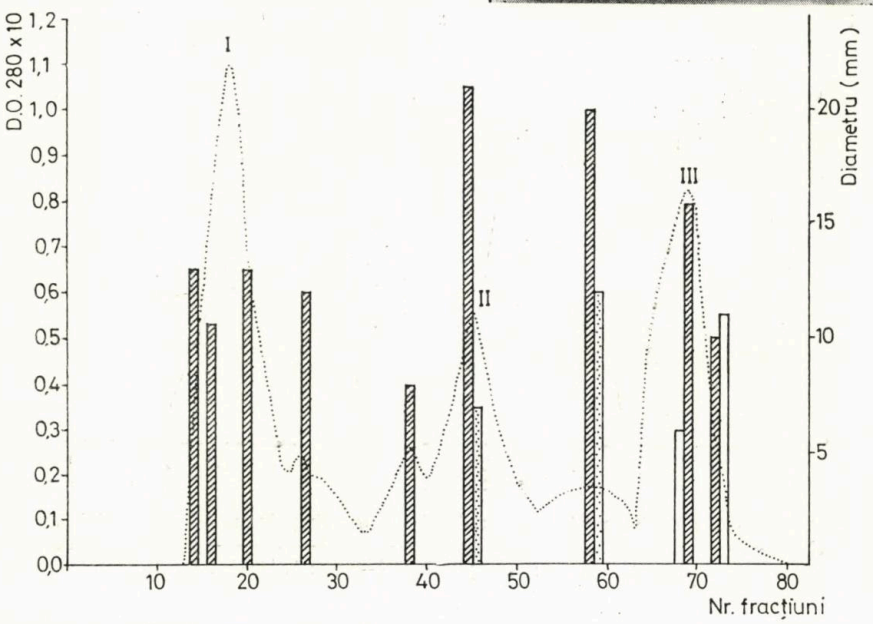


Fig. 5. — Distribuţia activităţii amilolitice la pH 4,8 tampon citrat 0,1 M (▭), pH 7 tampon fosfat 0,1 M (▭) şi pH 7 în prezenţa de $CuSO_4$ 1mM (▭) a preparatelor de NGF în cursul purificării pe Sephadex G—100.

piscului III DEAE, față de aceeași zonă din figura 4. De asemenea, activitatea slabă a piscurilor I ascendent, I descendent și II ascendent de la gel-filtrarea pe Sephadex este mai bine evidențiată cu metoda „prin imersie". Această metodă prezintă deci o sensibilitate mai mare decît metoda Schill și Schumacher și poate fi folosită pentru determinarea valo-

Tabela 1

Influența molarității tamponului de incubare asupra activității amilolitice în fracțiunile eluate de pe Sephadex G-100 și DEAE-celuloză (concentrația proteică a fiecărei probe : 20 μg/ml)

Fracțiunea nr.		Activitatea amilolitică (mm zonă difuzie) la pH 7	
		tampon fosfat 0,1 M	tampon fosfat 0,4 M
Sephadex G-100	I a_1	13	13
	I a_2	11	12
	I d	13	14
	I c	10	14
	II a	8	12
	II b	21	25
	III a	20	25
	III b	16	14
	III c	10	nevizualizată
DEAE-celuloză	I A	9	nevizualizată
	I	7	nevizualizată
	II	6,5	nevizualizată
	III A	7	10
	III B	15	16

rilor mici de activitate amilolitică. Pentru condiții obișnuite de lucru am ales metoda Schill și Schumacher, care are sensibilitate bună, reproductibilitate și exactitate foarte bune.

Utilizînd această metodă, am urmărit influența a diferiți factori asupra evidențierii activității amilolitice, și anume concentrația tamponului de incubare (tabela 1), pH-ul tamponului și prezența ionilor de Cu^{2+} (fig. 5).

Mărind concentrația tamponului fosfat pH 7 de la 0,1 la 0,4 M, se produce o creștere a diametrelor inelelor de difuzie la majoritatea probelor. Excepție fac cele în care activitatea amilazică este scăzută (diametru <1 cm) în tampon 0,1 M și care, după creșterea molarității la 0,4 M, nu mai pot fi vizualizate. Se pare că mărirea concentrației tamponului fosfat are un efect inhibitor asupra activității amilolitice, fapt de care trebuie să se țină seama în cazul metodelor ce recomandă astfel de concentrații (de exemplu, metoda „prin imersie") .

Influența celorlalți doi factori menționați anterior este ilustrată în figura 5 împreună cu distribuția activității amilazice în fracțiunile proteice obținute la gel-filtrarea pe Sephadex (metoda Schill și Schumacher).

La pH 7 se constată prezența activității amilazice în toate cele trei piscuri proteice, cele mai mari valori ale diametrelor inelelor de difuzie constatîndu-se în piscul al II-lea și al III-lea. În aceste două piscuri se observă și o inhibare a activității amilazice de către sulfatul de cupru. Acțiunea inhibitoare a ionilor metalelor grele (Hg^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+}) asupra

activității β-amilazice este cunoscută și a fost folosită chiar pentru diferențierea amilazelor α și β (9). Totuși, există lucrări care demonstrează că și α-amilazele sînt sensibile la acești ioni, care blochează gruparea sulfhidril, esențială pentru activitatea lor catalitică (10). Metode exacte de determinare diferențiată a activității celor două tipuri de enzime sînt cele care utilizează amiloza reticulată (substrat numai pentru α-amilaze) și amiloza nemodificată (substrat pentru ambele) (11).

Activitatea amilazică din piscul I este mai slabă decît în celelalte două piscuri proteice, cu atît mai mult cu cît cantitatea totală de proteină din acest pisc este mai mare decît în celelalte. Amintim că partea descendentă a acestui pisc conține NGF și este fracționată în continuare prin cromatografie pe DEAE-celuloză (1). De remarcat este însă prezența amilazelor în partea ascendentă a piscului I, în fracțiunile conținînd produși cu greutăți moleculare mari. Aceasta se poate explica prin tendința de complexare a amilazelor. După Kanno și Sudo (12), posibilitățile de complexare ale amilazelor sînt următoarele : polimerizarea amilazelor normale, complexarea cu imunoglobulinele, cu alte proteine plasmatice decît imunoglobulinele și cu substanțe neproteice de greutăți moleculare mari. Importanța acestei complexări trebuie văzută în legătură cu bolile autoimune. Rămîne de studiat în lucrări viitoare modul de complexare al amilazelor din zona de eluție amintită.

În ceea ce privește influența pH-ului asupra activității amilolitice, testarea activității la pH acid a dat rezultate pozitive numai pentru piscul al III-lea. În acest pisc, Wilson și Shooter (13) au semnalat prezența unei endopeptidaze β-NGF specifice, pe care o separă și purifică. Nu se știe dacă această endopeptidază acționează și asupra α-amilazei ; oricum, coexistența acestor două enzime nu pare imposibilă datorită rezistenței α-amilazei native la atacul proteazic. Ulrich și colab. (14) arătau că preparatele de amilază conțin adesea activitate proteolitică, dificil de îndepărtat, dar care nu deranjează în general măsurătorile de activitate amilazică.

Distribuția activității amilazice la fracțiunile separate pe DEAE-celuloză nu s-a mai putut reprezenta ca pentru cele din etapa de purificare anterioară (fig. 5), deoarece, așa cum ilustra și figura 4, în piscurile proteice corespunzătoare se evidențiază o activitate amilolitică foarte slabă. Aceasta arată că NGF, prezent în piscul al II-lea DEAE-celuloză, a fost separat de produșii care îl impurificau, printre care și amilazele.

Semnificația prezenței factorului de creștere a nervului (NGF) alături de amilaze în glandele submaxilare de șoarece, ca și a prezenței NGF în veninul de șarpe, ar putea fi legată, după unii autori, de digestie sau de alte funcții ale glandei, cum sînt producerea și eliberarea de substanțe toxice în salivă (15).

Este de remarcat de asemenea faptul că atît NGF, cît și activitatea amilazică a glandelor submaxilare sînt dependente de hormonii sexuali. Astfel, Smith și colab. (16) au observat apariția activității amilazice în glandele submaxilare de șoarece mascul în a 24-a zi de viață, imediat după apariția primelor diferențe morfologice între glandele submaxilare la mascul și femelă ; la femele, rezultate pozitive pentru activitatea amilazică s-au obținut abia după a 36-a zi de viață. Spre deosebire de glandele submaxilare, alte glande salivare (glandele parotide) nu prezintă astfel de diferențe. Pe de altă parte, concentrația NGF este de aproximativ 10 ori mai mare în glanda submaxilară de șoarece mascul decît în glanda de femelă

(15). Este posibil deci ca NGF, pe lîngă multiplele efecte la nivelul ţesutului nervos, să fie implicat şi într-o serie de funcţii de altă natură. Cercetări ulterioare vor putea lămuri semnificaţia corelaţiei NGF-amilaze-proteaze.

Prezentat la redacţie
la 12 iunie 1984

Institutul de ştiinţe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

AMYLOLYTIC ACTIVITY OF NGF FRACTIONS FROM MOUSE SUBMAXILLARY GLANDS

Summary

The amylolytic activity was investigated both in the mouse submaxillary glands homogenate and in the protein fractions from Sephadex G-100 gel-filtration and DEAE-cellulose chromatography (the steps of NGF purification). Three methods were comparatively used : the method described by Schill and Schumacher, the "sandwich" method and the method "by immersion". The influence of several factors on the amylase activity, determined by the method of Schill and Schumacher, was investigated : the buffer pH and concentration as well as the effect of Cu^{2+} ions. The assays showed positive results for amylase activity in the whole homogenate and in all protein fractions separated by Sephadex G-100 gel-filtration, those containing NGF included. The fractions obtained by the next step of NGF purification showed weak amylase-positive diffusion zones; the second DEAE-cellulose peak containing purified NGF failed to show any amylase activity.

BIBLIOGRAFIE

1. E. GANEA, E. MIHĂILESCU, R. BÎRNESCU, PAULA PRUNESCU, C. PRUNESCU, St. cerc. biochim., **26**, 31(1983).
2. ELENA GANEA, RODICA BÎRNESCU, St. cerc. biochim., **27**, 49 (1984).
3. S. NORBY, Exp. Cell. Res., **36**, 663 (1964).
4. M. MESSER, R. T. DEAN, Biochem. J., **151**, 171 (1975).
5. A. V. AMERONGEN, C. H. ODERKERK, A. P. VREUGDENHIL, P. A. ROUKEMA, Arch. oral Biol., **24**, 943 (1980).
6. S. VARON, J. NOMURA, E. M. SHOOTER, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **57**, 1782 (1967).
7. B. J. DAVIS, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
8. W. B. SCHILL, G. F. B. SCHUMACHER, Analit. Biochem., **46**, 502 (1972).
9. J. CLAUSEN, *Laboratory techniques in biochemistry in molecular biology*, North-Holland Publ. Comp., 1977.
10. V. ALEXANDRESCU, F. MIHĂILESCU, Rev. Roum. Biochim., **12**, 3 (1975).
11. M. A. MATEESCU, Biochimie, **60**, 535 (1978).
12. T. KANNO, K. SUDO, Clin. Chim. Acta, **76**, 67 (1977).
13. W. H. WILSON, E. M. SHOOTER, J. Biol. Chem., **254**, 6002 (1979).
14. R. ULRICH, G. KVESITADZE, A. SCHELTENBERGER, Acta Biol. Med. Germ., **41**, 509 (1982).
15. E. MIHĂILESCU, St. cerc. biochim., **24**, 201 (1981).
16. R. J. SMITH, J. FROMMER, R. SCHIFF, J. Histochem. Cytochem., **19**, 310 (1971).

EFECTUL SELENITULUI DE SODIU ASUPRA SISTEMULUI CELULAR DE APĂRARE ANTIOXIDATIVĂ

MARIA CIUGUDEANU, SILVIA GABOR*

Rezumat. S-a investigat experimental efectul selenitului de sodiu 0,5 și 0,05 ppm asupra activității glutationperoxidazei, glucozo-6-fosfatdehidrogenazei și conținutului în peroxizi lipidici din ficat și rinichi de șobolan. Administrarea zilnică de selenit de sodiu timp de 4 săptămîni crește semnificativ activitatea glutationperoxidazei și diminuează conținutul de lipoperoxizi hepatici și renali în raport cu doza de selenit. Activitatea glucozo-6-fosfatdehidrogenazei nu se modifică semnificativ prin administrarea de 0,05 ppm selenit.

Seleniul este un oligoelement esențial necesar organismelor vii, prevenind apariția unor boli atît la animale cît și la om (1), (2), (3), (4), (5), (6). În doze mari, seleniul este toxic, ceea ce motivează îngrijorarea în legătură cu creșterea consumului industrial al acestui element și riscul potențial sub raportul poluării mediului înconjurător (7), (8), (9). În acest context, stabilirea concentrațiilor netoxice de seleniu și în același timp esențiale organismelor este de mare actualitate. În prezent este cunoscut că deficitul de seleniu din hrana animalelor reprezintă o problemă economică mult mai importantă comparativ cu posibilele sale efecte toxice (8). Proteinele ce conțin seleniu sînt componenți esențiali ai unor sisteme enzimatice prezente la mamifere. Astfel, glutationperoxidaza, selenoenzimă a cărei activitate este corelată direct cu conținutul de seleniu alimentar (10), (11), (12), are un rol important în îndepărtarea surplusului de hidro- și lipoperoxizi, care apar atît în procesele fiziologice normale de îmbătrînire, cît și ca urmare a expunerii la diferite toxice sau a unui aport deficitar (13), (14), (15), (16). Activitatea glutationperoxidazei ca element component al sistemului antioxidant de apărare celulară (10), (11), (17) este condiționată de disponibilitatea în glutation redus (GSH), nivelul acestuia fiind menținut prin reducerea glutationului oxidat (GSSG) cu ajutorul NADPH-ului provenit pe linia shuntului pentozofosfaților și prin sinteza „de novo" de acid glutamic, cisteină și glicină.

Prezenta lucrare încearcă să stabilească acele doze de seleniu care, administrate la animale, să influențeze favorabil activitatea glutationperoxidazei, glucozo-6-fosfatdehidrogenazei și să limiteze formarea de peroxizi lipidici celulari.

S-au ales pentru studiu ficatul și rinichiul, organe vitale ale organismului.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a investigat experimental pe șobolani albi femele de derivație Wistar, în greutate de 160 — 190 g, efectul a două doze de selenit de sodiu ($Na_2SeO_3.5H_2O$ — Merck), administrate zilnic intragastric, timp de 4 săptămîni, în apa de băut.

S-au alcătuit următoarele loturi de animale : 1) martori, injectați intragastric cu apă în cantitate echivalentă loturilor intoxicate ; 2) animale tratate cu selenit de sodiu 0,05 ppm ; 3) animale tratate cu selenit de sodiu 0,5 ppm.

* Asistența tehnică : Maria Danciu.

După 4 săptămîni, animalele au fost sacrificate ; s-au prelevat ficatul şi rinichiul şi s-au determinat activitatea glutationperoxidazei (17), a glucozo-6-fosfatdehidrogenazei (kituri Merck) şi formarea de lipoperoxizi (18). Rezultatele obţinute au fost calculate statistic prin testul „t" Student şi reprezentate grafic în valori procentuale faţă de martor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Activitatea glutationperoxidazei în ficat şi rinichi la animalele tratate cu selenit 0,05 ppm şi 0,5 ppm este redată grafic in figura 1. S-a observat o creştere semnificativă statistic a activităţii enzimatice la ambele doze de selenit faţă de martor, ceea ce înseamnă că un aport exogen de

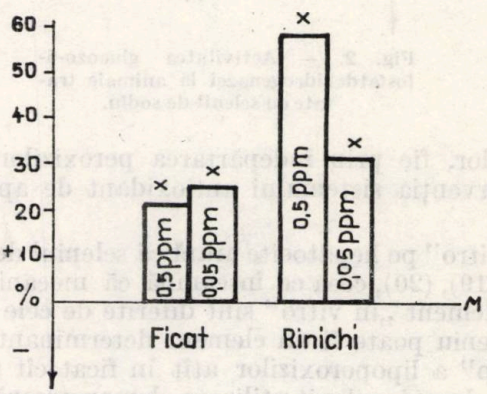


Fig. 1. — Glutationperoxidaza hepatică şi renală la animale tratate cu selenit de sodiu.

seleniu poate influenţa favorabil activitatea glutationperoxidazei hepatice şi renale. Glutationperoxidaza, selenoenzimă, are rolul de a îndepărta excesul de peroxizi lipidici tisulari, inhibînd astfel procesul de lipoperoxidare ca reacţie în lanţ a acizilor graşi cu duble legături. Formarea de lipoperoxizi este o reacţie fiziologică normală, care însă în exces poate cauza efecte negative asupra organismelor. Excesul de lipoperoxizi se formează şi în cazul în care este perturbată activitatea sistemului antioxidant de apărare celulară (12), funcţionalitatea acestuia — indeosebi activitatea glutationperoxidazei —fiind influenţată favorabil prin administrarea unor doze mici de seleniu.

Reprezentînd procentual faţă de martor activitatea glucozo-6-fosfatdehidrogenazei hepatice şi renale la animalele tratate cu 0,05 ppm selenit, am constatat o tendinţă de scădere nesemnificativă a activităţii enzimatice în ficat (fig. 2).

Conţinutul de lipoperoxizi tisulari hepatici şi renali (fig. 3) este semnificativ scăzut comparativ cu martorul, în acord cu doza de selenit administrată. Astfel, efectul antioxidant al seleniului, descris în literatură, se confirmă a fi benefic prin administrarea celor două doze de selenit de sodiu investigate (fig. 3).

Formarea de peroxizi lipidici celulari, ca urmare a oxidării acizilor graşi cu duble legături, este un fenomen ce se propagă în lanţ, conducînd

la slăbirea integrității și a funcționalității, la stabilirea și/sau dezintegrarea membranelor celulare. Prezența unor antioxidanți, cum sînt vitamina E și seleniul, poate diminua formarea excesivă de peroxizi celulari, fie prin pro-

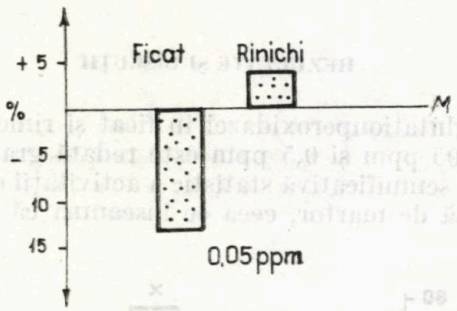


Fig. 2. — Activitatea glucozo-6-fosfatdehidrogenazei la animale tratate cu selenit de sodiu.

tecția membranelor, fie prin îndepărtarea peroxizilor formați în exces respectiv cu intervenția sistemului antioxidant de apărare celulară (10) (fig. 3).

Studii „in vitro" pe hepatocite arată că seleniul determină o creștere a lipoperoxizilor (19), (20), ceea ce înseamnă că mecanismele de protecție oferite de acest element „in vitro" sînt diferite de cele „in vivo" sau probabil doza de seleniu poate fi un element determinant al lipoperoxidării. Scăderea „in vivo" a lipoperoxizilor atît în ficat cît și in rinichi, determinată de ambele doze de selenit utilizate, demonstrează că seleniul în doze mici poate oferi protecție antioxidantă reacțiilor biochimice celulare, perturbate de diferiți factori.

În concluzie, un aport minor de seleniu, administrat sub formă de selenit, poate limita formarea excesivă de peroxizi lipidici celulari, exerci-

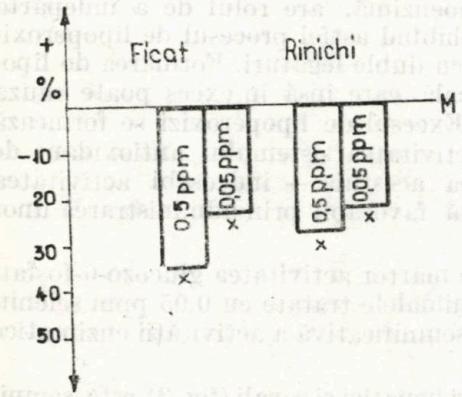


Fig. 3. — Lipoperoxizii celulari la șobolani tratați cu selenit de sodiu.

tînd un efect stimulator asupra activității sistemului endogen de apărare antioxidantă din ficat și rinichi, fapt ce subliniază intervenția multiplă a acestui oligoelement în biochimismul celular.

Prezentat la redacție
la 14 septembrie 1984

Institutul de igienă
și sănătate publică
Cluj-Napoca, str. Pasteur nr. 6

THE EFFECT OF SODIUM SELENITE ON THE CELLULAR ANTIOXIDATIVE DEFENSE SYSTEM

Summary

Two selenite (0.5 and 0.05 ppm) doses administered for 4 weeks in rats, as sodium selenite, on the glutathione-peroxidase, glucose-6 phosphate dehydrogenase activities and lipid peroxide content of the liver and kidney were studied.

The daily intake of two selected Na selenite doses for 4 weeks significantly decreased the tissue concentrations of lipid peroxides in both investigated organs. The decrease was dose dependent. In parallel glutathione peroxidase activity was found to be stimulated. No significant modification of glucose-6-P dehydrogenase activity as compared to the control group was observed.

BIBLIOGRAFIE

1. T. WESTERMARCK, P. RAUNU, M. KIRJARINTA, L. LAPPALAINEN, Acta Pharmacol. Toxicol., **40**, 465 (1976).
2. W. GUENTER, D. B. BRAGG, Poultry Sci., **56**, 2031 (1977).
3. J. D. LATSHAW, J. F. ORT, C. D. DIESEMA, Poultry Sci., **56**, 1876 (1977).
4. M. JACOBS, C. FROST, J. Toxicol. Environm. Health, **8**, 587 (1981).
5. M. JACOBS, C. FROST, J. Toxicol. Environm. Health, **8**, 575 (1981).
6. H. J. ROBBERECHT, H. A. DEELSTRA, Clin. Chim. Acta, **136**, 107 (1984).
7. G. C. WILBER, Clin. Toxicol., **17**, 171 (1980).
8. M. T. LO, E. SANDI, J. Environm. Path. Toxicol., **4**, 193 (1980).
9. E. M. BEM, Environm. Health Perspect., **37**, 183 (1981).
10. C. K. CHOW, Amer J. Clin. Nutrit., **32**, 1066 (1979).
11. C. K. CHOW, Internat. J. Vit. Nutrit. Res., **49**, 182 (1979).
12. S. GHERGARIU, *Oligominerale și oligomineraloze*, Edit. Academiei, București, 1980.
13. M. MIHARA, M. UCHIYAMA, K. FUKUZAWA, Biochem. Med., **23**, 302 (1980).
14. J. S. BUS, J. E. GOBSON, *Reviews in Biochemical Toxicology*, vol. I, sub red. J. R. BEND, R. M. PHILPOT, North-Holland Publ., Amsterdam, 1979, p. 125–149.
15. S. GABOR, Z. ANCA, E. BORDAȘ, Kadmium Symposium Yena, 170 (1979).
16. S. GABOR, Z. ANCA, E. ZUGRAVU, M. CIUGUDEANU, B. BÖHM, *The in vitro effects of mineral dusts*, sub red. R. C. BRAUN, M. CHAMBERLAIN, R. DAVIES, I. P. GORMELY, Academic Press, New York, 1980, p. 131–137.
17. R. OLINESCU, S. NIȚĂ, Rev. Roum. Biochim., **10**, 119 (1973).
18. F. MASUGI, T. NAKAMURA, Internat. J. Vit. Nutrit. Res., **46**, 187 (1970).
19. N. H. STACEY, C. D. KLAASSEN, J. Toxicol. Environm. Health, **7**, 139 (1981) .
20. N. H. STACEY, C. D. KLAASSEN, J. Toxicol. Environm. Health, **7**, 149 (1981).

EFECTUL TOXIC AL DIFERITELOR DOZE DE CADMIU ASUPRA SISTEMULUI ANTIOXIDATIV DIN RINICHI ŞI FICAT

MARIA CIUGUDEANU, SILVIA GABOR*

Rezumat. S-a investigat experimental pe şobolani efectul diferitelor doze de cadmiu (20 ppm doză unică, 2 ppm şi 20 ppm doze repetate zilnic, 4 săptămîni) asupra formării de peroxizi lipidici, activităţii glutationperoxidazei şi glucozo-6-fosfatdehidrogenazei în rinichi şi ficat. Creşterea semnificativă a lipoperoxizilor renali, provocată prin administrarea unei doze singulare de Cd 20 ppm a Cd 2 ppm zilnic timp de 4 săptămîni, poate fi pusă pe seama inhibiţiei semnificative a glutationperoxidazei (GSHpx) şi a glucozo-6-fosfatdehidrogenazei (G-6-PDh), elemente componente ale sistemului celular de apărare antioxidantă. Scăderea semnificativă a lipoperoxizilor renali după 4 săptămîni de administrare zilnică a Cd 20 ppm se poate explica prin deplеţia de NADPH (constatată la dozele mai mici de cadmiu — 20 ppm doză unică şi 2 ppm doză repetată 4 săptămîni), care, la rîndul său, afectează sinteza lipidelor, conducînd în final la epuizarea substratului lipidic.
În ficat, efectul cadmiului, 2 ppm administrat zilnic timp de 4 săptămîni şi în special Cd 20 ppm doză unică, este mult atenuat datorită abundenţei sistemelor de detoxifiere, stimularea glucozo-6-fosfatdehidrogenazei şi un exces de NADPH fiind necesare activităţii acestora.

Cadmiul determină diverse forme de toxicitate atît la animale cît şi la om, îndeosebi asupra rinichiului şi ficatului. În literatură există date ce demonstrează formarea în exces de lipoperoxizi în rinichi şi testicule sub acţiunea cadmiului (1), proces ce s-ar putea explica prin inhibarea activităţii glutationperoxidazei (2).

Organismele vii posedă sistemul de detoxifiere a glutationperoxidazei, echipament endogen alcătuit din glutationperoxidază, glutationreductază şi glucozo-6-fosfat dehidrogenază, cu rol în îndepărtarea peroxizilor formaţi în exces şi în transformarea lor în alcooli lipidici stabili (3), (4).

Prezentul studiu şi-a propus drept obiectiv investigarea experimentală pe şobolani a efectului a două doze de cadmiu, administrate unic şi repetat, asupra formării de peroxizi lipidici, asupra activităţii glutationperoxidazei şi glucozo-6-fosfat dehidrogenazei în rinichi şi ficat.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experimentul a fost efectuat pe şobolani albi, femele, de provenienţă Wistar, în greutate de 170 — 200 g.

Variantele experimentale au constat din administrarea, unică şi repetată, a două doze de cadmiu la patru loturi de animale, astfel constituite : 1) cadmiu 2 ppm ; 2) cadmiu 20 ppm ; ambele doze au fost administrate zilnic timp de 4 săptămîni ; 3) cadmiu 2 ppm doză unică ; 4) lot martor. Cadmiul a fost administrat intragastric sub formă de clorură, iar lotul de animale martor a fost tratat pe aceeaşi cale cu apă de robinet. Toate cele patru loturi de animale au fost sacrificate după 4 săptămîni de la iniţierea experimentului.

La sacrificare s-au prelevat ficatul şi rinichii în vederea determinării conţinutului de lipoperoxizi prin reacţia cu acid tiobarbituric, revelatoare a formării de malondialdehide (5), a activităţii glutationperoxidazei (6) şi a glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (kituri Merck). Pentru fiecare parametru s-a calculat testul de semnificaţie „t" Student, luîndu-se în considerare ca variaţie semnificativ statistică valori ale lui „p" egale şi mai mici decît 0,05. Rezultatele obţinute, exprimate în procente faţă de martor, sînt reprezentate în grafice (fig. 1 şi 2).

* Asistenţa tehnică : Maria Danciu.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele obținute arată că administrarea de cadmiu 20 ppm în doză unică și 2 ppm în doză repetată zilnic timp de 4 săptămîni acționează la nivel renal prin inducerea în exces a conținutului de peroxizi lipidici tisulari (fig. 1). Inhibiția semnificativă a activității glutationperoxidazei

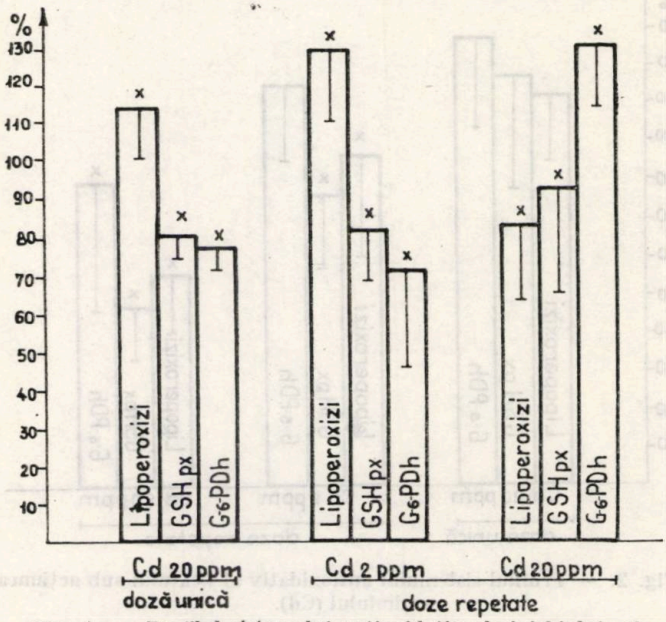


Fig. 1. — Profilul sistemului antioxidativ al rinichiului sub acțiunea cadmiului (Cd).

și glucozo-6-fosfatdehidrogenazei ca elemente componente ale sistemului antioxidant de apărare celulară explică creșterea cantității de lipoperoxizi renali.

Acumularea preferențială a cadmiului în rinichi ca organ țintă, cu valori duble celor găsite în ficat (7), exercită un efect inhibitor asupra activității celor două enzime cu rol în descompunerea peroxizilor lipidici formați în exces. Scăderea semnificativă a lipoperoxizilor renali, constatată în cazul administrării repetate timp de 4 săptămîni a dozei de 20 ppm, poate fi explicată prin scăderea activității G-6-PDh și depleția de NADPH observată în fazele anterioare, ceea ce duce la afectarea sintezei acizilor grași și a colesterolului și deci la epuizarea substratului lipidic. Alterarea biochimică a rinichiului prin acțiunea cadmiului 20 ppm doză unică și 2 ppm doză repetată 4 săptămîni este similară. După administrarea zilnică a cadmiului 20 ppm timp de 4 săptămîni, răspunsul biochimic al rinichiului este complet diferit comparativ cu celelalte două doze de cadmiu. S-ar părea că organismul face un supraefort, un răspuns în „salt", evidențiat prin creșterea activității G-6-PDh, care furnizează ca factori reducători (NADPH) necesari multiplelor procese oxidoreductive.

În cazul dozelor de cadmiu experimentate, răspunsul biochimic al ficatului este total diferențiat față de cel al rinichiului (fig. 2). Astfel, după administrarea unei singure doze de cadmiu 20 ppm, s-a obținut o ușoară

creştere a activităţii G-6-PDh şi a glutationperoxidazei hepatice, fapt ce sugerează un proces de adaptare celulară a organismului la dozele mici de cadmiu, similar cu cel descris de Nordberg şi colab. (8), care arată că un pretratament cu cadmiu induce rezistenţă la acţiunea letală a unei doze secundare de cadmiu.

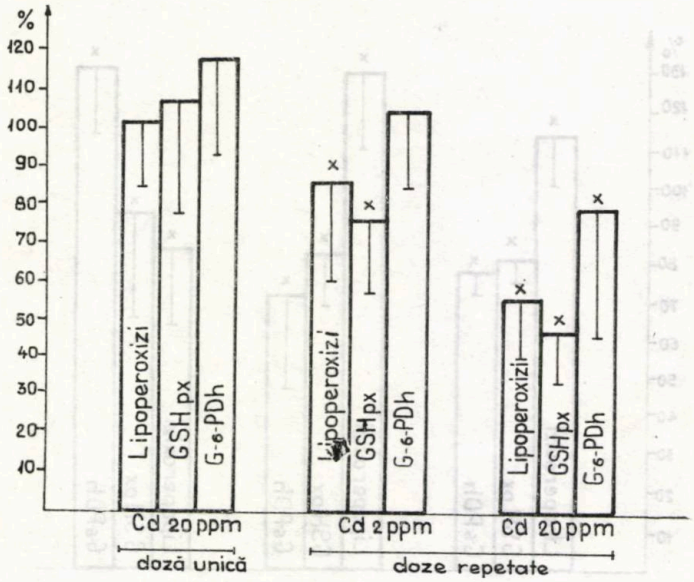


Fig. 2. — Profilul sistemului antioxidativ al ficatului sub acţiunea cadmiului (Cd).

După administrarea zilnică a unor doze de 2 ppm şi 20 ppm Cd pe o perioadă de 4 săptămîni, s-a constatat o scădere semnificativă a activităţii glutationperoxidazei şi a conţinutului de lipoperoxizi în ficat. Reducerea semnificativă a glutationperoxidazei în ficat şi rinichi confirmă toxicitatea specifică a cadmiului pentru grupările —SH (2), (3).

Toxicitatea hepatică redusă a unei singure doze de cadmiu (20 ppm) comparativ cu rinichiul este probabil datorată abundenţei sistemelor de detoxifiere. Activitatea G-6-PDh, menţinută la un nivel superior comparativ cu ceilalţi parametri aflaţi în studiu, trădează o suprasolicitare a mecanismelor de detoxifiere hepatică. Răspunsul rinichiului, comparativ cu ficatul, este mai direct, mai prompt, fără să aibă posibilitatea să atenueze acţiunea toxică a cadmiului. Detoxifierea hepatică este posibilă fie prin sinteza de cadmiutioneină (9), (10), (11), fie probabil chiar prin implicarea citocromului P_{450} (12), (13), (14).

Scăderea lipoperoxizilor tisulari hepatici, în acord cu doza de cadmiu administrată (fig. 2), este un indiciu al afectării sintezelor lipidice de către cadmiu (15), care se repercutează asupra proceselor de peroxidare lipidică.

Unele date din literatură pun în discuţie dezacordul dintre producerea de lipoperoxizi şi alte distrucţii celulare provocate de cadmiu pe hepatocite izolate (16). Rezultatele noastre au arătat toxicitatea specific renală a cadmiului prin producerea de lipoperoxizi, ca urmare a inhibiţiei glutationperoxidazei şi glucozo-6-fosfatdehidrogenazei, existînd şi alte meca-

nisme, ca inhibiția adenozintrifosfatazei, inhibiția funcției mitocondriale asociată cu lipidperoxidarea, interacțiunea cu grupările —SH (17). Modificările biochimice ale organelor implicate în metabolizarea și eliminarea cadmiului conduc în final la modificări de structură. Astfel, la doza de 20 ppm, administrată zilnic 4 săptămîni, s-au constatat alterări distrofice de tip vascular, granular, la nivelul tubilor proximali renali, precum și modificări atît ale parenchimului hepatic, cît și ale spațiului interstițial.

În concluzie, se poate afirma că afectarea patobiochimică a rinichiului este total diferențiată față de cea a ficatului. Dacă în rinichi primează fenomenul de lipoperoxidare a acizilor grași provocat de cadmiu, în ficat s-a observat un proces de adaptare la dozele mici de cadmiu, urmat apoi de decompensarea răspunsului biochimic la dozele crescute.

Prezentat la redacție
la 24 septembrie 1984

*Institutul de igienă
și sănătate publică
Cluj-Napoca, str. Pasteur nr. 6*

THE EFFECT OF CADMIUM ON THE CELLULAR ANTIOXIDATIVE DEFENSE SYSTEM

Summary

Cadmium chloride was administered intragastrically to white rats in a single dose (20 ppm cadmiu) and in repeated doses (2 ppm and 20 ppm cadmium), daily for 4 weeks.

Lipid peroxides, glutathione peroxidase (GSHpx) and glucose-6-phosphatedehydrogenase (G-6-PDh) activities were measured in the liver and kidney.

The treatment of rats with the single dose Cd20 ppm and repeated doses of 2 ppm caused a significant increase of lipid peroxides and a decrease of GSHpx and G-6-PDh activities in the kidney. The significant downwards levels of lipoperoxides in the kidney after a daily administration of Cd20 ppm may be explained by tne NADPH depletion which diminishes the synthesis of fatty acids, with a subsequent exhaustion of tissue lipid substrates.

In contrast, liver was affected to a lesser extent by cadmium due to the complex detoxification systems located in this organ.

BIBLIOGRAFIE

1. GABOR S., ANCA Z., BORDAȘ E., Kadmium Symposium, Jena, 1979, p. 170—174.
2. SPLITTGERBER A. G., TAPPEL A. L., Arch. Biochem. Biophys., **197**, 534—542 (1979).
3. CHOW C. K., Amer. J. Clin. Nutrit., **32**, 1066 — 1081 (1979).
4. BUS J. S., GIBSON J. E., *Reviews in Biochemical Toxicology*, vol. I, sub red. E. HODGSON, J. R. BEND, R. M. PHILPOT, North-Holland Publ., Amsterdam, 1979, p. 125—149.
5. MASUGI F., NAKAMURA T., Internat. J. Vit. Nutrit. Res., **46**, 187—191 (1976).
6. OLINESCU R., NIȚĂ S., Rev. Roum. Biochim., **10**, 119—125 (1973).
7. LOESER E., LORKE D., Toxicology, **7**, 215—224 (1977).
8. NORDBERG G. F., PISCATOR M., LIND B., Acta Pharmacol. Toxicol., **29**, 456—470 (1971).

9. WEBB M., *Metabolic targets of metal toxicity*, in *Clinical Chemistry and Clinical Toxicology of Metals*, sub red. S. BROWN, North-Holland, Biomed. Press, 1977, p. 51–64.
10. BREMNER I., HOEKSTRA W. G., DAVIES N. T., JOUNG B. W., Chem. Biol. Interactions, **23**, 355–367 (1978).
11. CHERIAN M. G., NORDBERG M., Toxicology, **28**, 1–5 (1983).
12. KRASNY H. C., HOLBROOK D. J., Molec. Pharmacol.. **13**, 759–765 (1977).
13. LUI F. M. K., LUCIER G. W., J. Pharmacol. Exp. Ther., **212**, 211–216 (1980).
14. EATON D. L., STACEY N. H., WONG K. L., KLAASSEN C. D., Toxicol. Appl. Pharmacol., **55**, 393–402 (1980).
15. LEE D. J. W., McBARNES C. M., J. Reprod. Fert., **27**, 25–29 (1971).
16. STACEY N. H., KLAASSEN C. D., J. Toxicol. Environm. Health, **7**, 149–158 (1981).
17. STACEY N. H., KLAASSEN C. D., J. Toxicol. Environm. Health, **7**, 139–147 (1981).

DINAMICA IMUNOGLOBULINELOR DIN ILEUMUL COBAILOR IMUNIZAȚI CU VACCINURI RIBOZOMALE BACTERIENE

I. F. DUMITRU, V. CIALÂCU, V. DIMA*, MIOARA MANCIULEA **, DANA IORDĂCHESCU

Rezumat. Imunoglobulinele din ileumul de cobai au fost separate prin precipitare cu sulfat de amoniu, urmată de gel-cromatografie pe Sephadex G-200. Prin electroforeză în gel de agaroză și prin imunoelectroforeză au fost identificate diferitele tipuri de anticorpi: IgM, IgA și IgG, evidențiindu-se că imunoglobulinele A se găsesc în cele mai mari concentrații. Imunizarea cu vaccinuri ribozomale izolate de la *Salmonella typhi, S. typhimurium, Escherichia coli* și *Shigella flexneri* induce o creștere a biosintezei imunoglobulinelor, în cel mai mare grad în cazul utilizării fracțiunilor ribozomale de la *E. coli* și *S. typhi*. În toate cazurile se constată o creștere a conținutului în IgA, sugerînd un răspuns imun în anticorpi de tip A. Conținutul în IgM crește numai în cazul imunizării cu vaccinuri robozomale de la *S. typhi* și *E. coli*, iar cel în IgG în cazul tratamentului cu ribozomi de la *S. typhi, S. typhimurium* și *Sh. flexneri*. Cea mai mare antigenicitate o manifestă ribozomii izolați de la *S. typhi*, care induc creșterea biosintezei tuturor tipurilor de anticorpi.

Mucoasa intestinală a fost caracterizată de mulți autori drept un țesut limfoid deosebit de activ în biosinteza IgA (1) — (5), proces care poate fi indus de prezența unui material antigenic în lumenul intestinal (5). Numărul celulelor producătoare de IgA este redus în intestinul animalelor animalelor nou-născute și al celor adulte „germ-free". După naștere si după contactul cu mediul înconjurător, mucoasa intestinală devine populată cu celule care biosintetizează IgA.

Imunoglobulinele A au fost identificate în mucoasa intestinală a animalelor normale și a celor bolnave, fiind tipul de anticorp care predomină la acest nivel. Se pare că stimularea antigenică locală prin infecții virale conduce la biosinteza IgA în intestin, acest tip de anticorp jucînd un rol important în mecanismele de apărare ale organismului față de alergene și microorganisme (6). Din datele existente în literatura de specialitate rezultă că răspunsul imun și tipul de anticorpi elaborați în intestin depind de natura antigenului, de titrul său și de tipul de imunizare (7). De asemenea, a fost semnalată și prezența celulelor producătoare de IgG și IgM în intestinul subțire, în boala celiac și în stomac în anemia pernicioasă (18).

În ultimul timp s-au realizat multe cercetări privind imunogenitatea fracțiunilor ribozomale izolate de la diferite microorganisme patogene, efectuîndu-se numai analize ale imunității umorale. Cu toate acestea, natura părții imunogenice a acestor fracțiuni ribozomale este necunoscută. Astfel, Venneman și colab. (9), (10) au sugerat că partea imunogenă poate fi un acid ribonucleic, termostabil și rezistent la acțiunea RN-azei sau un complex ARN-proteină, în timp ce Johnson (11) a evidențiat proprietățile imunogene ale unei proteine ribozomale. Eisenstein (12) și Medina și colab. (13) consideră că imunogenicitatea este datorată antigenului O, care contaminează atît ARN, cît și proteinele ribozomale.

În această lucrare s-au urmărit modificările principalelor clase de imunoglobuline la nivelul ileumului cobailor nou-născuți, imunizați pre- și post-partum cu fracțiuni ribozomale izolate de la diferite specii de enterobacterii: *Salmonella typhi, S. tyhphimurium, Escherichia coli* și *Shigella flexneri.*

MATERIALE ŞI METODE

Fracţiunile ribozomale crude din cele patru enterobacterii au fost preparate conform procedeului descris de Kita şi Kashiba (14). În cadrul procedeului de imunizare, cobăiţe gestante (la aproximativ 38 de zile) au fost imunizate subcutanat cu cîte trei doze de preparat ribozomal microbian (2 mg proteine/doză) la intervale de 7 zile. După două săptămîni de la naştere, cobaii nou-născuţi au fost imunizaţi oral cu o singură doză de preparat ribozomal. După 7—10 zile de la imunizare, cobaii tineri au fost sacrificaţi şi s-a prelevat ileumul.

Imunizarea s-a realizat cu preparate ribozomale izolate de la patru microorganisme patogene : *S. typhi* (produce febră tifoidă), *S. typhimurium* (produce toxiinfecţii), *E. coli* (produce colite) şi *Shigella flexneri* (produce dezinterie), realizîndu-se studii comparative ale imunoglobulinelor din ileumul cobailor de control şi al animalelor imunizate.

Separarea imunoglobulinelor din mucoasa ileumului s-a efectuat din 15 g ţesut, care au fost mojarate în prezenţă de nisip de cuarţ şi de 150 ml tampon fosfat salin (0,0063 M Na_2HPO_4, 0,0019 M KH_2PO_4, 0,0027 M KCl şi 0,14 M NaCl) de pH 7,2, iar după o oră de extracţie omogenatul a fost centrifugat 15 min la 4 000 rotaţii/min, păstrîndu-se supernatantul.

Purificarea imunoglobulinelor din ileumul de cobai s-a realizat prin precipitarea lor cu sulfat de amoniu la o saturaţie de 33 %. Precipitatul format a fost spălat cu o soluţie de sulfat de amoniu cu saturaţie de 33 %, după care a fost dizolvat în tampon fosfat salin şi dializat 48 de ore faţă de aceeaşi soluţie tampon. γ-Globulinele au fost separate prin cromatografiere pe o coloană de Sephadex G-200 (70 × 2 cm), gelul fiind echilibrat într-o soluţie Tris-HCl 0,1 M, pH 8, care conţine NaCl 1 M. După aplicarea probei (70 mg proteine) pe coloană, s-a procedat la eluţia acesteia cu aceeaşi soluţie tampon, cu o viteză de 25 ml/oră, colectîndu-se fracţiuni de cîte 1,5 ml, care au fost analizate din punctul de vedere al absorbţiei la 280 nm. Piscurile proteice eluate au fost concentrate prin ultrafiltrare pe o celulă Amicon la 3 atm. Concentratele au fost dializate faţă de soluţia tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, care conţine NaCl 1 M, timp de 48 de ore şi analizate imunologic.

Determinarea calitativă a imunoglobulinelor din ileumul de cobai a fost realizată prin imunoelectroforeză (15) şi prin electroforeză în gel de agaroză (16) .

Determinarea cantitativă a imunoglobulinelor din ileumul de cobai a fost realizată prin metoda Lowry şi colab. (17).

Evidenţierea tipului de anticorpi din mucoasa ileumului de cobai s-a efectuat după prepararea antiserurilor : anti-γ-globulinelor serice şi a anti-IgG serice de cobai. Obţinerea γ-globulinelor din serul de cobai s-a realizat prin precipitare cu sulfat de amoniu la o saturaţie de 33 %. Purificarea IgG din serul de cobai s-a efectuat prin cromatografie de afinitate pe o coloană de proteină A-Sepharose CL-4 B (18), cu dimensiunile 10,5 × 0,8 cm şi cu o capacitate de legare de 25 mg IgG/ml gel. Eluţia proteinelor serice nelegate s-a realizat cu 20 ml tampon fosfat salin, pH 7,2. IgG fixată pe coloană a fost eluată cu o soluţie de acid acetic 0,3 M.

Antiserurile au fost obţinute prin imunizarea intradermică a 10 iepuri (trei injecţii — 2,5 mg proteine/kg corp — la interval de 14 zile). Antigenul a fost administrat asociat cu adjuvantul Freund complet. La 10 zile de la ultima imunizare s-a procedat la sîngerarea iepurilor. Testarea antiserurilor s-a realizat prin imunoelectroforeză (15), prin dublă-difuzie (19) şi prin hemaglutinare (20), folosindu-se hematii de oaie îmbrăcate în antigenele respective fixate cu glutaraldehidă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Inducerea unui răspuns imun la nivelul ileumului, la puii de cobai imunizaţi (în stadiul de făt şi imediat după naştere) cu preparate ribozomale izolate de la patru microorganisme patogene, a fost investigată prin dozarea γ-globulinelor precipitate cu sulfat de amoniu din extractele proteice totale obţinute din ileumul animalelor de control şi al celor imunizate. În tabela 1 sînt prezentate rezultatele acestor determinări. Se constată că în toate cazurile de tratamente cu vaccinuri ribozomale are loc o creştere a conţinutului în γ-globuline la nivelul intestinului, în cel mai mare grad în cazul imunizării cu preparatul izolat de la *E. coli* (cu 28,9 % faţă de experimentul de control) şi de la *S. typhi* (cu 24,2 %). Aceste rezultate experimentale indică faptul că nu toate preparatele ribozomale testate au avut aceeaşi eficienţă asupra animalelor.

Tabela 1

Conținutul în γ-globuline din mucoasa ileumului cobailor de control și al celor tratați cu preparate ribozomale

Lot cobai	mg γ-globuline/g țesut	%
Control	0,605	100
Imunizați cu preparate ribozomale izolate de la :		
S. typhi	0,752	124,3
S. typhimurium	0,669	110,6
E. coli	0,780	128,9
Sh. flexneri	0,614	101,5

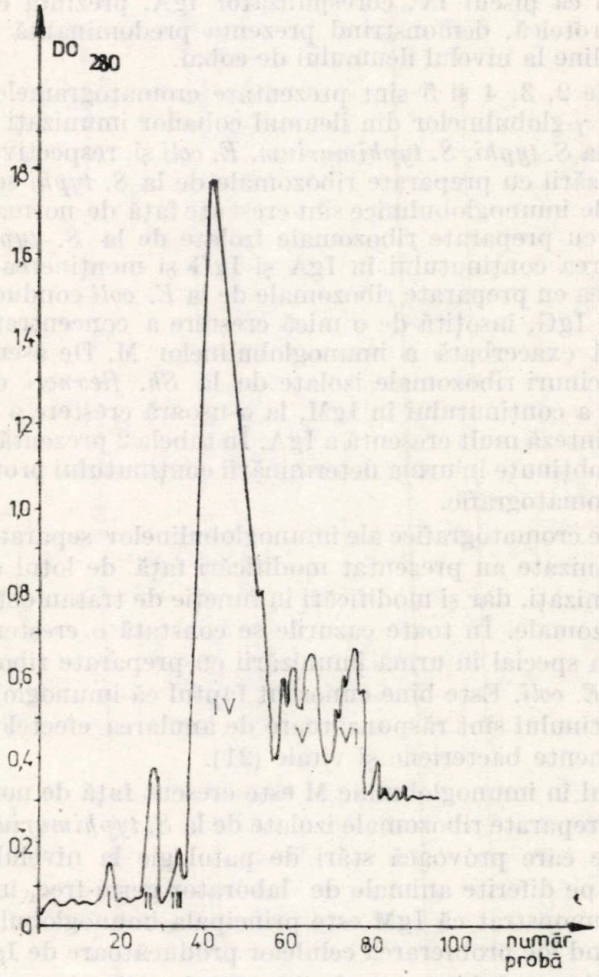


Fig. 1. — Curba de eluție a γ-globulinelor din mucoasa ileumului de cobai (lot de control) pe o coloană de Sephadex G-200. Prin imunoelectroforeză și electroforeză în gel de agaroză s-a evidențiat că piscul I este constituit din IgM, piscurile II, III și IV din IgA, iar piscurile V și VI din IgG.

Preparatele de γ-globuline separate din ileumul cobailor de control și al celor imunizați cu preparate ribozomale au fost supuse cromatografierii pe Sephadex G-200, în scopul separării diferitelor tipuri de imunoglobuline. În figura 1 prezentăm curba de eluție a imunoglobulinelor separate cromatografic din ileumul cobailor de control. Identificarea diferitelor tipuri de imunoglobuline în piscurile proteice separate cromatografic s-a realizat prin imunoelectroforeză și prin electroforeză în gel de agaroză. Prezența unui singur arc de precipitare în complexul anti-IgG—probă indică existența imunoglobulinelor G. Dacă aceeași probă nu dă reacție de imunoprecipitare cu anti-IgG, dar dă arcuri de precipitare cu anti-γ-globulinele, este indicată prezența IgA și/sau IgM. Ultimele două tipuri de imunoglobuline au fost identificate prin electroforeză în gel de agaroză. Se separă șase piscuri proteice, dintre care piscul I este alcătuit din IgM, piscurile II, III și IV din IgA și piscurile V și VI din IgG. Se remarcă faptul că piscul IV, corespunzător IgA, prezintă cea mai mare concentrație proteică, demonstrînd prezența predominantă a acestui tip de imunoglobuline la nivelul ileumului de cobai.

În figurile 2, 3, 4 și 5 sînt prezentate cromatogramele obținute în urma separării γ-globulinelor din ileumul cobailor imunizați cu preparate ribozomale de la *S. typhi*, *S. typhimurium*, *E. coli* și, respectiv, *Sh. flexneri*. În cazul imunizării cu preparate ribozomale de la *S. typhi* se constată că toate fracțiunile imunoglobulinice sînt crescute față de normal. La animalele imunizate cu preparate ribozomale izolate de la *S. typhimurium* se remarcă creșterea conținutului în IgA și IgG și menținerea constantă a IgM. Imunizarea cu preparate ribozomale de la *E. coli* conduce la scăderea conținutului în IgG, însoțită de o mică creștere a concentrației de IgA și de o biosinteză exacerbată a imunoglobulinelor M. De asemenea, tratamentul cu vaccinuri ribozomale izolate de la *Sh. flexneri* conduce la o ușoară scădere a conținutului în IgM, la o ușoară creștere a concentrației IgG și la o biosinteză mult crescută a IgA. În tabela 2 prezentăm rezultatele experimentale obținute în urma determinării conținutului proteic în piscurile separate cromatografic.

Profilurile cromatografice ale imunoglobulinelor separate din ileumul animalelor imunizate au prezentat modificări față de lotul de control al cobailor neimunizați, dar și modificări în funcție de tratamentul cu diferite preparate ribozomale. În toate cazurile se constată o creștere a conținutului în IgA, în special în urma imunizării cu preparate ribozomale de la *Sh. flexneri* și *E. coli*. Este bine cunoscut faptul că imunoglobulinele A de la nivelul intestinului sînt răspunzătoare de anularea efectelor produse de diferite componente bacteriene și virale (21).

Conținutul în imunoglobuline M este crescut față de normal în cazul imunizării cu preparate ribozomale izolate de la *S. typhimurium* și *S. typhi*, microorganisme care provoacă stări de patologie la nivelul intestinului subțire. Studii pe diferite animale de laborator germ-free, în primele zile de viață, au demonstrat că IgM este principala imunoglobulină secretată (22), inițial avînd loc proliferarea celulelor producătoare de IgM.

Cu excepția cazului în care cobaii au fost imunizați cu preparate ribozomale de la *S. typhimurium*, tratamentele cu acest tip de vaccinuri produce creșterea conținutului în IgG, anticorpi ce apar mai ales în timpul răspunsului imun secundar. IgG însă poate traversa bariera placentară

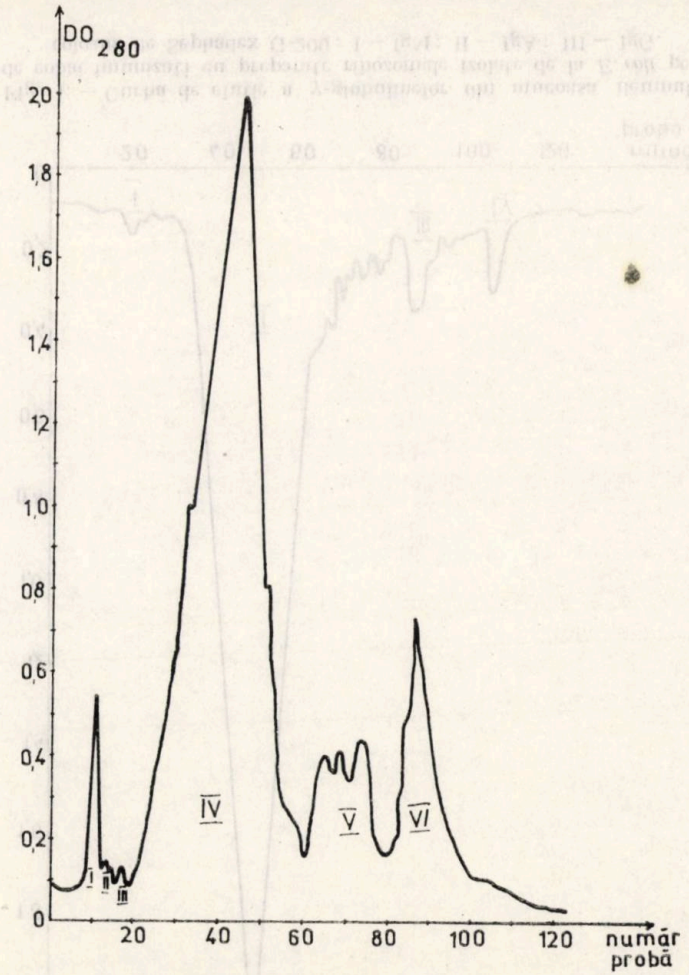


Fig. 2. — Cromatograma γ-globulinelor separate din mucoasa ileumului de cobai imunizat cu preparat ribozomal de la *S. typhi*, obținută în urma separării pe Sephadex G-200. Semnificația piscurilor I—VI este : I—IgM ; II, III și IV—IgA ; V și VI—IgG.

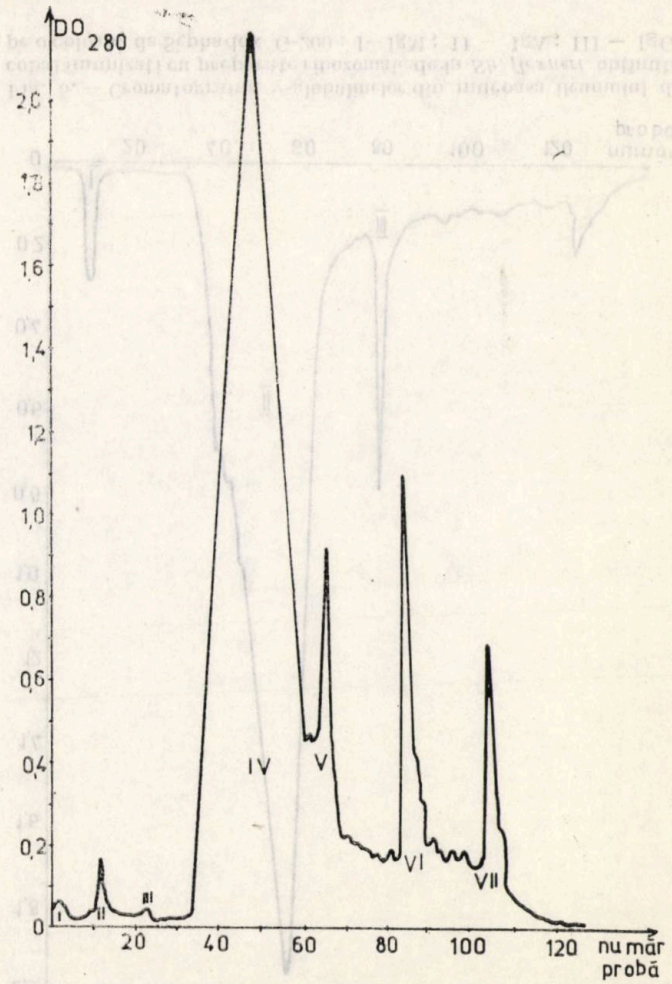


Fig. 3. — Curba de eluție a γ-globulinelor separate din mucoasa ileumului de cobai imunizat cu preparate ribozomale de la *S. typhimurium* pe o coloană de Sephadex G-200 : I — IgM ; IV și V — IgA ; VI și VII — IgG.

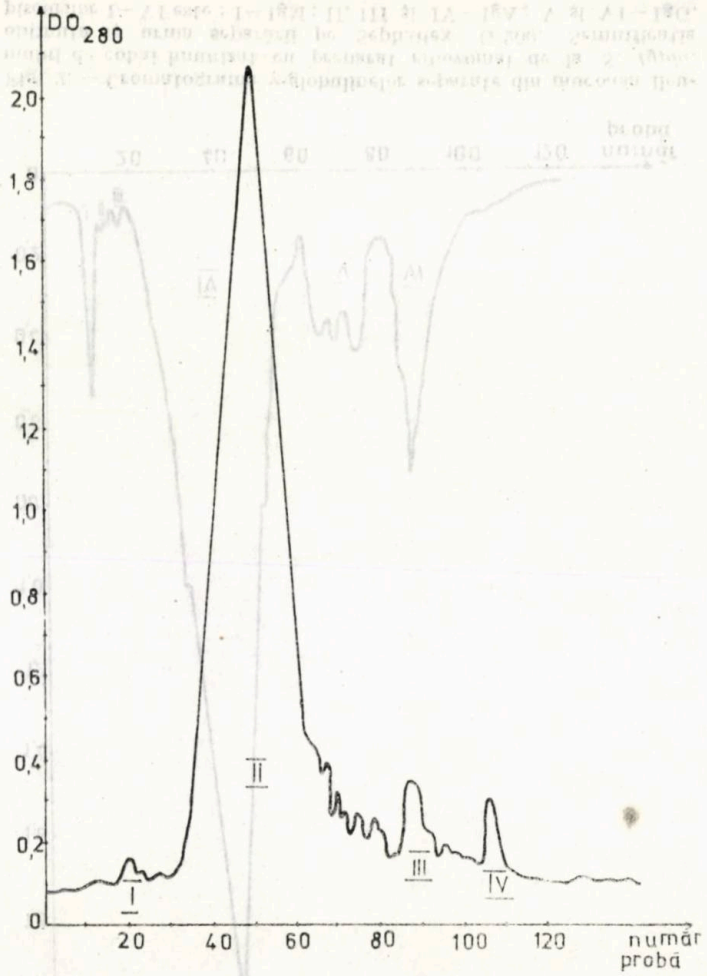


Fig. 4. — Curba de eluție a γ-globulinelor din mucoasa ileumului de cobai imunizați cu preparate ribozomale izolate de la *E. coli* pe o coloană de Sephadex G-200 : I — IgM ; II — IgA ; III — IgG.

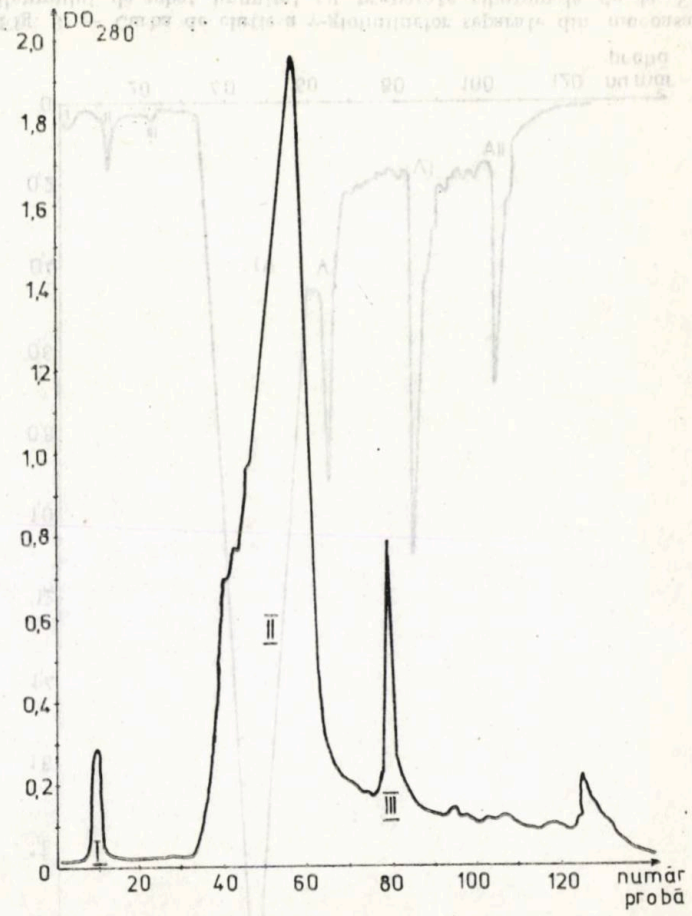


Fig. 5. — Cromatograma γ-globulinelor din mucoasa ileumului de cobai imunizați cu preparate ribozomale de la *Sh. flexneri*, obținută pe o coloană de Sephadex G-200 : I — IgM ; II — IgA ; III — IgG.

de la mamă la făt (23), difuzînd mai ușor decît celelalte clase de imunoglobuline în spațiile extravasculare, unde îndeplinesc rolul de a neutraliza toxinele bacteriene și a facilita procesele de fagocitoză (24).

Tabela 2

Conținutul în diferite tipuri de imunoglobuline din ileumul cobailor de control (1) și al celor tratați cu preparate ribozomale izolate de la *S. typhi* (2), *S. typhimurium* (3), *E. coli* (4) și *Sh. flexneri* (5)

Ig (mg)	Lot cobai 1	2	3	4	5
IgM	1,36	1,57	1,93	1,36	1,32
IgA	33,31	37,00	35,47	40,75	44,95
IgG	6,75	8,97	2,71	8,25	7,32

Dintre cele patru vaccinuri ribozomale testate, antigenicitatea cea mai mare este prezentată de preparatul ribozomal izolat de la *S. typhi*, care a indus la nivelul ileumului un răspuns imun în anticorpi IgA, IgM și IgG.

Prezentat la redacție
la 17 octombrie 1984

Facultatea de biologie
București, Splaiul Independenței nr. 91—93
**Institutul „Dr. I. Cantacuzino"*
București, Splaiul Independenței nr.103
***Institutul „Dr. V. Babeș"*
București, Splaiul Independenței, nr. 101

DYNAMICS OF IG IN GUINEA PIG ILEUM IMMUNIZED WITH BACTERIAL RIBOSOMAL VACCINES

Summary

The immunoglobulins from the guinea pig ileum were separated by precipitation with ammonium sulfate and by gel chromatography on Sephadex G-200 column. Different types of antibodies IgM, IgA and IgG were identified by electrophoresis in agarose gel and by immunoelectrophoresis, the immunoglobulin A being found in the highest concentration. The immunization with ribosomal vaccines isolated from *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* induces an increase of the immunoglobulin biosynthesis, to the greatest extent as a result of using ribosomal fractions from *E. coli* and *S. typhi*. In all cases, an increase of the IgA content has been noticed, showing an immune response in the IgA type antibodies. The IgM content increases only as a result of immunization with ribosomal vaccines from *S. typhi* and *E. coli*, and the IgG content only in the case of the treatment with ribosomes from *S. typhi*, *S. typhimurium* and *Sh. flexneri*. The highest antigenicity is shown by ribosomes isolated from *S. typhi* which induce the increase in the biosynthesis of all types of antibodies.

BIBLIOGRAFIE

1. P. L. OGRA, A. MORAG, K. R. BEUTNER, in *The Immune System and Infectious Diseases*, Proc. 4 th Int. Convoc. Immunol., sub red. E. NETER, F. MILGROM, Karger, Basel, 1975, p. 322.
2. R. FRETER, Infect. Immun., **2**, 556 (1970).
3. P. A. CRABBE, D. R. NASH, H. BAZIN, H. EYSSEN, J. F. HEREMANS, J. Exp. Med., **130**, 723 (1969).
4. P. A. CRABBE, A. O. CARBONARA, J. F. HEREMANS, Lab. Invest., **14**, 235 (1965).
5. D.S. EDDIE, M. L. SHULKIND, J. B. ROBBINS, J. Immunol., **106**, 181 (1971).
6. A. J. HUSBAND, H. J. MONIE, J. L. GOWANS, in *Immunology of the Gut*, Ciba Foundation Symposium 46, Elsevier, 1977, p. 29.
7. P. BRANDTZAEG, K. BAKLIEN, in *Immunology of the Gut*, Ciba Foundation Symposium 46, Elsevier, 1977, p. 77.
8. R. J. SHINER, J. BALLARD, Gut, **14**, 778 (1973).
9. M. R. VENNEMAN, N. J. BIGLEY, L. J. BERRY, Infect. Immun., **1**, 574 (1970).
10. M. R. VENNEMAN, Infect. Immun., **5**, 269 (1972).
11. W. JOHNSON, Infect. Immun., **8**, 395 (1973).
12. T. K. EISENSTEIN, Infect. Immun., **12**, 364 (1975).
13. S. MEDINA, S. I. VAS, H. G. ROBSON, J. Immunol., **114**, 1720 (1975).
14. E. KITA, S. KASHIBA, Infect. Immun., **27**, 197 (1980).
15. P. GRABAR, P. BURTIN, *Immunoelectrophoretic Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 25.
16. P. STELOS, in *Handbook of Experimental Immunology*, sub red. D. M. WEIR, Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1967, p. 10.
17. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. A. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 165 (1961).
18. T. KRISTIANSEN, Biochim. Biophys. Acta, **263**, 567 (1974).
19. R. K. JENNINGS, F. MALONE, J. Path. Bact., **74**, 81 (1957).
20. J. S. INGRAHAM, Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y., **95**, 452 (1958).
21. R. M. GOLDBLUM, S. ASLSTEDT, B. CARLSSON, L. A. HANSON, U. JODAL, G. LIDIN-JANSON, A. SOHL-AKERLUND, Nature, **257**, 797 (1975).
22. W. D. ALLEN, P. PORTER, J. Immunol., **24**, 365, 493 (1973).
23. R. E. BILLINGHAM, Mount Sinai J. Med., **47**, 550 (1980).
24. P. S. WELLS, H. S. HSU, Infect. Immun., **2**, 145 (1970).

UNELE PROBLEME DE PATOLOGIE MOLECULARĂ ÎN CARCINOGENEZA CHIMICĂ. I. INTERACȚIUNEA ACIDULUI DEOXIRIBONUCLEIC CU COMPUȘI POLICICLICI

Z. GÂRBAN*, ȘT. HOLBAN**, MARIA BRAZDĂ***, D. CIUBOTARIU**, G. VĂCĂRESCU***

Rezumat. Definirea mai riguroasă a elementelor de patogenie caracteristice proceselor neoplazice impune cunoașterea mecanismelor carcinogenezei chimice.

Studiul interacțiunii acidului deoxiribonucleic (ADN) cu compuși policiclici evidențiază modificările conformaționale ale macromoleculei poliheteronucleotidice, prezentînd o imagine a leziunilor biochimice care interesează patologia moleculară.

Din grupa compușilor policiclici cu acțiune cancerigenă se discută hidrocarburile policiclice aromate, acetilaminofluorenul, aflatoxina B_1 și aminoazobenzenul, prezentîndu-se unele aspecte ale interacțiunilor cu macromolecula ADN. Aducții formați prin legarea compușilor policiclici la bazele azotate purinice și pirimidinice din ADN reprezintă structuri bioincompatibile care definesc leziunile moleculare. Acestea, la rîndul lor, pot evolua spre procese neoplazice, care afectează integritatea structurală și funcțională a sistemelor biologice.

Inexistența unor fruntarii riguroase între investigațiile cu caracter biochimic, biofizic și morfofuncțional în abordarea sistemelor biologice a fost demonstrată de procesele realizate în ultimele decenii. Aceste domenii diferite, întregindu-se reciproc, permit o abordare mai cuprinzătoare a diversității și unității proceselor care guvernează lumea vie.

În oncogeneză, proces indus de agenți chimici, fizici sau biologici (unele virusuri), este importantă cunoașterea mecanismelor care determină transformarea malignă. În acest context, patologia moleculară urmărește substratul biochimic și biofizic al proceselor care afectează integritatea structurală și funcțională a sistemelor biologice (1), (2). Astfel este vizată desfășurarea proceselor la nivel molecular, cu predilecție particularitățile interacțiunii acidului deoxiribonucleic cu agenți cancerigeni (3), (4) în perspectiva integrării crescînde de la cele mai simple pînă la cele mai complexe nivele de organizare. O exemplificare în acest sens o constituie succesiunea nivelelor molecular, cromozomial, celular, tisular etc. De remarcat că aceste nivele presupun o integrare de la simplu la complex : cromozomul reprezintă mediul macromoleculelor de acid deoxiribonucleic (ADN), celula reprezintă mediul cromozomilor, țesutul mediul celulelor, organul mediul țesuturilor ș.a.m.d. Rezultă că acest grandios edificiu al materiei vii reprezintă nivelele de organizare deosebite prin creșterea numărului de elemente și prin gradul de integrare. Organismul luat ca un întreg prezintă o integrare structurală și implicit o integrare funcțională. La o scară mai mare se poate considera că un interes deosebit prezintă populația, privită ca o unitate genetică în evoluție.

Studiile morfofuncționale abordînd stările normale și patologice se pot adresa diverselor nivele de integrare (5), (6), (7), (8). Astfel, din punctul de vedere al patologiei, se disting domeniile de patologie geografică, patologie specială (dezvoltată adesea pe aparate și sisteme), patologie celulară și moleculară (5), (8), (9), (10), (11). Patologia geografică se adresează celui mai înalt nivel de integrare — populația, interesînd distribuția geografică a bolilor cu aspectele de pan-, epi- și en-demie (-zootie). Pato-

logia specială se adresează indivizilor din diverse specii, particularităților organice ale acestora. Patologia celulară, termen lansat de Virchow (1858), situează la baza bolii leziunea celulară (7). În fine, patologia moleculară a fost prezentată de Schade (1923) ca un domeniu complementar al patologiei celulare (10), (11). Acest domeniu definește cauzele și mecanismele fizico-chimice în stările morbide, abordînd problema etiopatologiei la nivel molecular (12), (13).

Conceptul de patologie moleculară a căpătat un conținut restrictiv odată cu progresele biologiei moleculare (9), (11). Caracterele particulare ale leziunilor moleculare genetice au permis ca Pauling (1942) să delimiteze mai clar domeniul patologiei moleculare (14). Astăzi se acceptă că modificările genetice ale macromoleculelor informaționale, în primul rînd acidul deoxiribonucleic, pot avea consecințe patologice, determinînd leziuni moleculare. Modificările structurale, dată fiind dimensiunea macromoleculei, pot afecta zone moleculare restrînse, uneori doar deoxiribonucleotide. În astfel de condiții, transferul informației genetice de la ADN la proteine este posibil (15), dar implică perturbări funcționale.

În etapa actuală, preocupările sînt orientate spre aprofundarea aspectelor infrastructurale și moleculare caracteristice proceselor patologice. În acest context, elucidarea mecanismelor moleculare în etiopatogenie prezintă un deosebit interes pentru cunoașterea evoluției clinice și a instituirii procedeelor terapeutice (3), (5), (9).

STRUCTURA SECUNDARĂ A ADN. PARTICULARITĂȚI STEREOCHIMICE

În patologia moleculară, un aspect de vîrf este reprezentat de investigațiile privitoare la interacțiunile ADN cu diverse substanțe organice (compuși policiclici : hidrocarburi, derivați ai cumarinei, ai aminoazobenzenului etc.) (1), (6), (16), (17), (18), (19) și anorganice (săruri metalice) (20).

Macromolecula poliheteronucleotidică a ADN prezintă o structură helicală dicatenară (fig. 1). În dublul helix, catenele au o dispunere complementară și antiparalelă. Legăturile de hidrogen dintre baze, adenină-timină (A-T) și guanină-citozină (G-C), sînt prezentate în accepția modelului Watson-Crick (21). În macromolecula dicatenară se generează efecte antagoniste între forțele de extensie a lanțului, determinate de repulsia grupărilor fosfatice, și forțele de legătură dintre baze (legăturile de hidrogen intercatenare, forțele de înstivuire a perechilor de baze), care determină apariția segmentelor caracteristice structurii secundare helicale (15), (22).

Interacțiunile dintre molecule organice sau anorganice cu ADN din sistemele biologice au fost atestate prin corespondența care există între afinitatea pentru macromoleculă și puterea cancerigenă (16). Studii privind interacțiunile de acest tip, efectuate „in vitro" sau „in vivo", au permis să se deceleze asociații moleculare și complecși chelatici de un considerabil interes biologic. Datele biochimice și biofizice acumulate, suplimentate cu observații morfofuncționale, au condus la surprinzătoare constatări privind relația structură chimică—activitate biologică la ADN, contribuind astfel la importante progrese ale cunoașterii în acest domeniu (1), (3).

În cursul interacțiunilor compușilor policiclici cu ADN apar modificări conformaționale care schimbă parametrii sterici ai macromoleculei. Remarcăm faptul că prin studii fizico-chimice s-au decelat diverse tipuri (genuri sau specii) de ADN, caracterizate prin conformații diferite ale

dublului helix. Între parametrii geometrici care caracterizează structurile secundare ale conformerilor se disting translația (h) și diversele unghiuri interne: unghiul de rotație a grupelor de baze (winding), unghiul de rotație dintre bazele perechi în plan vertical (twisting) și în plan orizontal

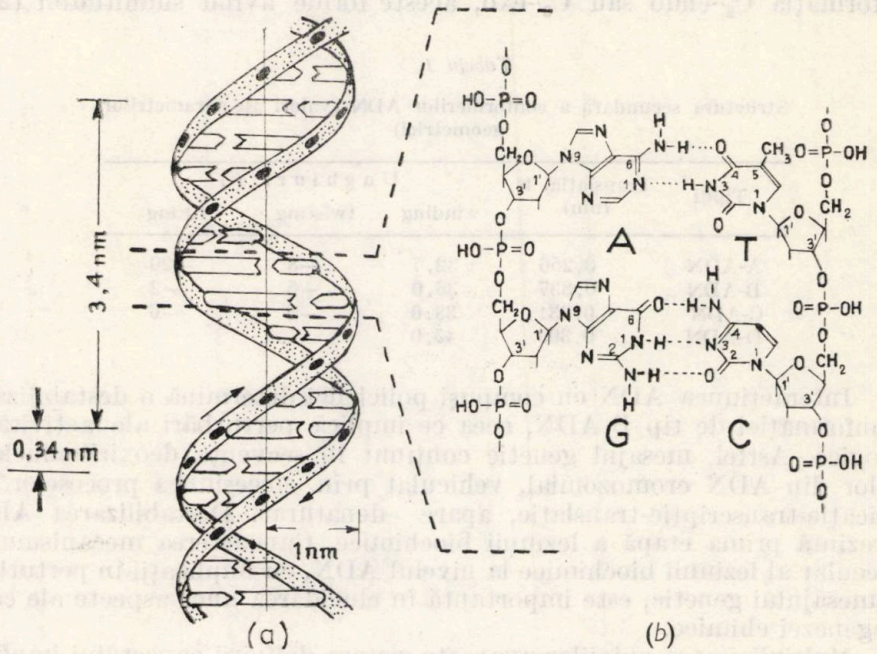


Fig. 1. — Macromolecula ADN dicatenar : (*a*) prezentare sterică ; (*b*) legarea catenelor complementare și antiparalele.

(tilting). O imagine a unghiurilor twist și tilt este prezentată în figura 2 (prin D s-a notat distanța dintre centrul de gravitate al bazelor și axul dublului helix). Valorile caracteristice acestor parametri geometrici (22),

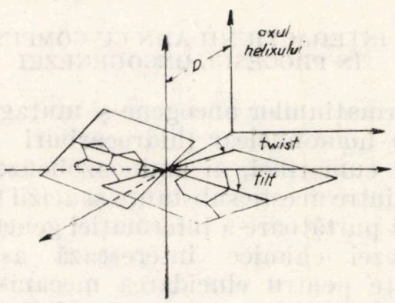


Fig. 2. — Modificări unghiulare la conformațiile ADN.

(23) pentru cele patru tipuri de ADN cunoscute (A, B, C, D) se prezintă în tabela 1. Diferențele stereochimice întîlnite la aceste tipuri sînt determinate de parametrii amintiți, în special unghiurile de torsiune ale nucleotidelor

reziduale (numite adesea unghiuri conformaţionale). Unghiurile conformaţionale sînt cu predilecţie determinate de deoxiriboză (conformaţiile endo şi exo raportate la atomii $C_{2'}$ şi $C_{3'}$) şi de legăturile fosfodiesterice, bazele azotate avînd o structură rigidă. În natură se întîlneşte în mod curent tipul conformaţional B-ADN. La acest tip, deoxiriboza prezintă conformaţia $C_{2'}$-endo sau $C_{3'}$-exo, aceste forme avînd similitudini (23).

Tabela 1

Structura secundară a conformerilor ADN (valori ale parametrilor geometrici)

Tipul	Translaţia, h (nm)	Unghiuri (°)		
		winding	twisting	tilting
A-ADN	0,256	32,7	−8	+20
B-ADN	0,337	36,0	+5	−2
C-ADN	0,331	38,6	−5	−6
D-ADN	0,303	45,0		

Interacţiunea ADN cu compuşi policiclici determină o destabilizare a conformaţiei de tip B-ADN, ceea ce implică perturbări ale activităţii biologice. Astfel, mesajul genetic conţinut în secvenţa deoxiribonucleotidelor din ADN cromozomial, vehiculat prin succesiunea proceselor de replicaţie-transcripţie-translaţie, apare denaturat. Destabilizarea ADN reprezintă prima etapă a leziunii biochimice. Cunoaşterea mecanismului molecular al leziunii biochimice la nivelul ADN, cu implicaţii în perturbarea mesajului genetic, este importantă în elucidarea unor aspecte ale carcinogenezei chimice.

Multiplicitatea opiniilor avansate asupra definirii cancerului implică coordonarea eforturilor interdisciplinare. În astfel de situaţii, arată Delarue şi Mignot (5), cercetătorul are tendinţa de a deveni prizonierul propriilor metode, al disciplinei şi al tehnicilor sale, cunoscînd prea puţin rezultatele întreprinse în alte direcţii şi prin alte mijloace. Progresul investigaţiilor interdisciplinare, contribuţia biochimiei analitice şi cuantice, a biofizicii, morfologiei, fiziopatologiei au permis conturarea unor concepţii noi asupra etiopatogeniei în carcinogeneza chimică (1), (2), (5), (9).

IMPLICAŢIILE INTERACŢIUNII ADN CU COMPUŞI POLICICLICI ÎN PROCESUL ONCOGENEZEI

Inducerea neoformaţiunilor oncogene şi mutagene de către compuşii policiclici (CP) de tip homonuclear (hidrocarburi aromatice) sau heteronuclear (derivaţi ai cumarinei, ai aminoazobenzenului etc.) a sugerat ipoteza interacţiunii dintre aceste substanţe şi acizii nucleici, cu predilecţie ADN—macromoleculă purtătoare a informaţiei genetice (1), (3), (14), (24). În procesul oncogenezei chimice interesează aspectele de patologie moleculară, importante pentru elucidarea mecanismelor care determină denaturarea relaţiei structură—activitate la ADN, urmată de modificări morfofuncţionale la nivel biologic.

Prezente în mediul ambiant, poluînd uneori aerul, alimentele şi apa, substanţele policiclice se pot constitui în agenţi patogeni potenţiali. Aceste substanţe apar în unele procese tehnologice din industriile cocsochimică şi petrochimică, în produsele reziduale de la alte industrii, precum

și în gazele de combustie rezultate de la autovehicule, țigarete, sisteme de încălzire a încăperilor etc. În alimente, substanțele amintite pot să apară prin procese de preparare sau conservare a produselor alimentare în cadrul unor tehnologii specifice acestei industrii sau accidental. Evident, substanțele respective se pot întîlni în ape industriale reziduale.

Compușii policiclici sînt caracterizați prin două trăsături distincte. Prima constă în planaritatea moleculei, orice deviație de la forma plană (spre exemplu, hidrogenerarea unuia dintre inelele benzenice la un inel de ciclohexan neplanar) ducînd la modificarea activității biologice. A doua trăsătură este dată de existența unui mare număr de electroni π delocalizați, a căror densitate maximă este la periferia moleculei, legăturile transanulare fiind sărace în electroni (6), (19), (25). Aceste trăsături trebuie luate în considerație dacă se pun în corelație structura și activitatea, cunoscîndu-se că reactivitatea depinde de geometria și de energia stării de tranziție, care va apărea în interacțiunea CP cu ADN.

În figura 3 se prezintă compuși policiclici cu acțiune cancerigenă, între care unele hidrocarburi policiclice aromatice (HPA) : (I) benz(a)pire-

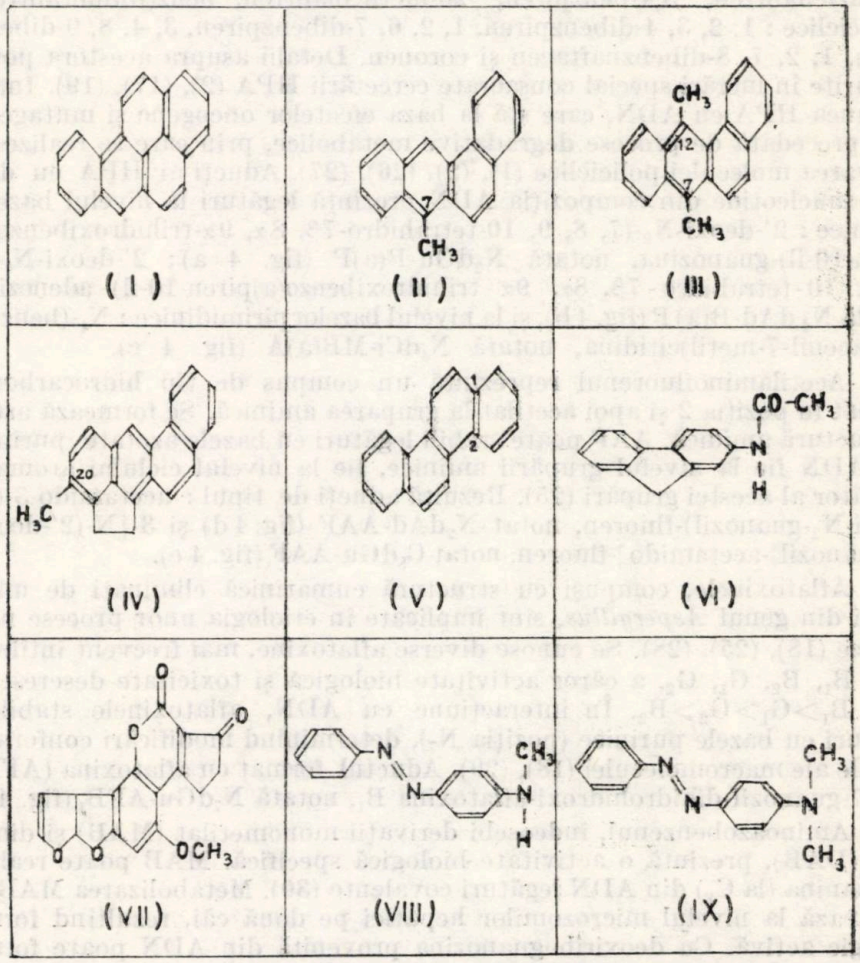


Fig. 3. — Compuși policiclici cu acțiune cancerigenă : (I) B(a) P ; (II) MB(a)A ; (III) DMB(a)A ; (IV) 20—MC ; (V) BF ; (VI) AAF ; (VII) AFB_1 ; (VIII) MAB ; (IX) DMB.

nul B(a)P; (II) 7-metilbenz(a)antracenul MB(a)A; (III) 7,12-dimetilbenz (a)antracenul DMB(a)A; (IV) 20-metilcolantrenul 20-MC; (V) 1,2-benzfenantrenul (crisenul) BF. De asemenea se redau și compuși aparținînd altor clase de substanțe, cum sînt: (VI) 2-acetilaminofluorenul AAF; (VII) alfatoxina B_1AFB_1; (VIII) N-metil-4-amino-azobenzenul MAB; (IX) N-dimetil-4-amino-azobenzenul DMB.

În urma infracțiunii CP cu ADN, vizate fiind cu predilecție deoxiribonucleotidele purinice și (în puține cazuri) deoxiribonucleotidele pirimidinice, apar compuși cu structură particulară, numiți aducți. Legăturile se stabilesc la nivelul bazelor azotate heterociclice.

Hidrocarburile policiclice aromatice reprezintă cea mai vastă clasă de substanțe din cadrul CP cancerigeni. În această clasă se includ hidrocarburi triciclice: antracen, 9-metilantracen, 9-fenilantracen, fenantren; tetraciclice: tetracen (naftacen), 1,2-benzantracen, 7, 8-benzfenantren, piren, crisen (1,2-benzfenantren); pentaciclice: pentacen, 1,2,3,4-dibenzantracen, 1,2, 5, 6-dibenzantracen, 1, 2, 7, 8-dibenzfenantren, 5, 6, 7, 8-dibenzfenantren, 3,4-benzpiren, 20-metilcolantren, benz(b)fluorantren; hexaciclice: 1, 2, 3, 4-dibenzpiren, 1, 2, 6, 7-dibenzpiren, 3, 4, 8, 9-dibenzpiren, 1, 2, 7, 8-dibenznaftacen și coronen. Detalii asupra acestora pot fi urmărite în lucrări special consacrate cercetării HPA (2), (17), (19). Interacțiunea HPA cu ADN, care stă la baza efectelor oncogene și mutagene, este precedată de procese degradative metabolice, prin care se realizează activarea moleculei policiclice (1), (2), (26), (27). Aducți ai HPA cu deoxiribonucleotide din compoziția ADN prezintă legături la nivelul bazelor purinice: 2′-deoxi-N_2-(7, 8, 9, 10-tetrahidro-7β, 8α, 9α-trihidroxibenzo(a) piren-10-il)-guanozina, notată N_2dGu-B(a)P (fig. 4 a); 2′-deoxi-N_4-(7, 8, 9, 10-tetrahidro-7β, 8α, 9α-trihidroxibenzo(a)piren-10-il)-adenozina, notată N_4dAd-B(a)P (fig. 4 b), și la nivelul bazelor pirimidinice: N_4-(benz[a] antracenil-7-metil)citidina, notată N_4dCi-MB(a)A (fig. 4 c).

Acetilaminofluorenul reprezintă un compus de tip hidrocarbonat aminat în poziția 2 și apoi acetilat la gruparea aminică. Se formează astfel o structură amidică. AAF poate stabili legături cu bazele azotate purinice din ADN fie la nivelul grupării aminice, fie la nivelul ciclului aromatic purtător al acestei grupări (25). Rezultă aducți de tipul: acetamido-3-(2′-deoxi-N_2-guanozil)-fluoren, notat N_2dAd-AAF (fig. 4 d) și 3-[N-(2′-deoxi--8-guanozil)-acetamido]-fluoren, notat C_8dGu-AAF (fig. 4 e).

Aflatoxinele, compuși cu structură cumarinică eliminați de unele specii din genul *Aspergillus*, sînt implicate în etiologia unor procese neoplazice (18), (25), (28). Se cunosc diverse aflatoxine, mai frecvent întîlnite fiind B_1, B_2, G_1, G_2, a căror activitate biologică și toxicitate descresc în seria $B_1 > G_1 > G_2 > B_2$. În interacțiune cu ADN, aflatoxinele stabilesc legături cu bazele purinice (poziția N_7), determinînd modificări conformaționale ale macromoleculei (18), (29). Aductul format cu aflatoxina (AFB_1) este 7-guanozil-dihidrohidroxi-aflatoxina B_1, notată N_7dGu-AFB_1 (fig. 4 f).

Aminoazobenzenul, îndeosebi derivații monometilat (MAB) și dimetilat (DAB), prezintă o activitate biologică specifică. MAB poate realiza cu guanina (la C_8) din ADN legături covalente (30). Metabolizarea MAB se realizează la nivelul microzomilor hepatici pe două căi, rezultînd forma biologic activă. Cu deoxiriboguanozina provenită din ADN poate forma aductul 8-deoxiguanozil-N-metil-4-amino-azobenzen, notat C_8dGu-MAB (fig. 4 g).

Existența aducților determină destabilizarea macromoleculelor de ADN prin extensia, distorsia și lezionarea dublului helix. Astfel,conformația dublu helicală înregistrează o modificare structurală, ceea ce implică și

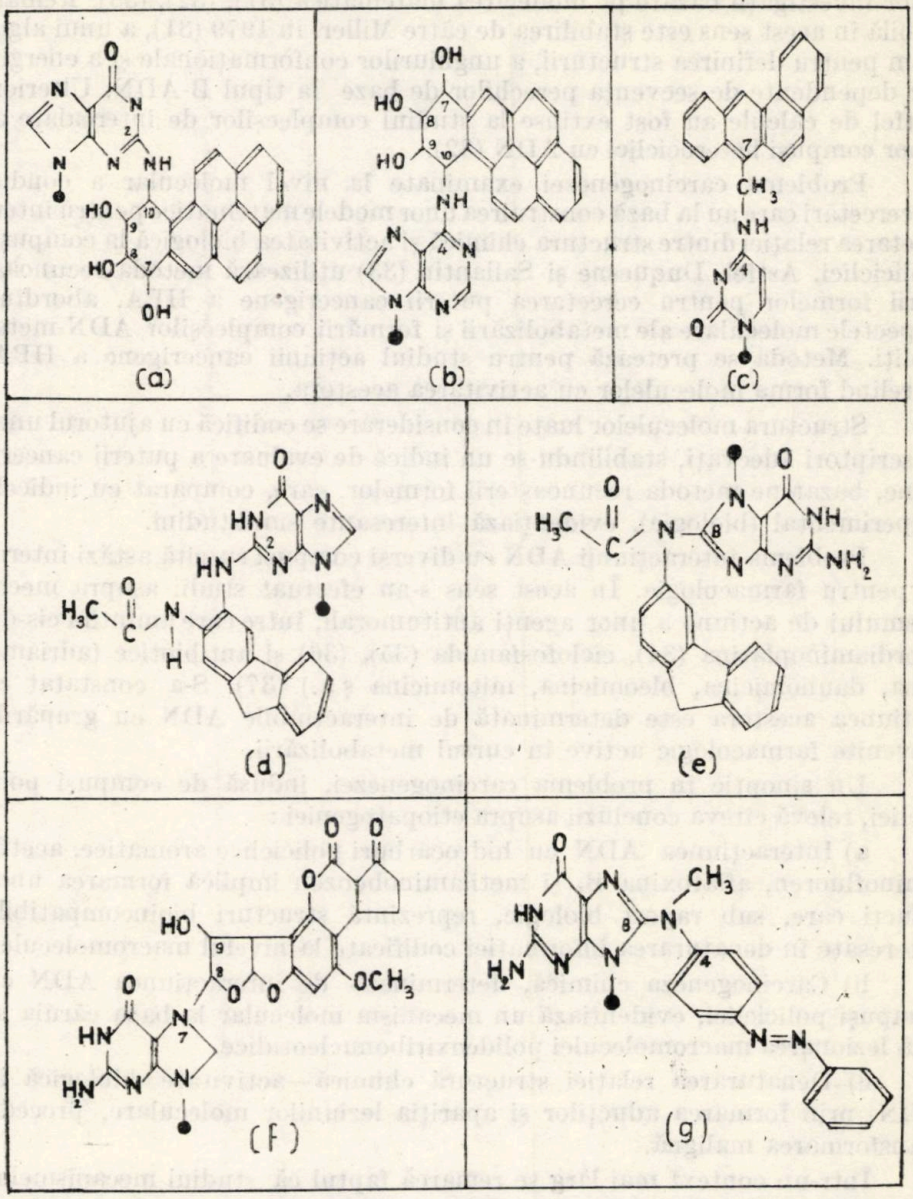


Fig. 4. — Structura unor aducți de tipul compus policiclic — deoxiribonucleotid (semnul ● reprezintă legătura spre catena ADN) : (*a*) N_2dGu-B(a)P ; (*b*) N_4dAd-B(a)P ; (*c*) N_4dCi-MB(a)A ; (*d*) N_2dAd-AAF ; (*e*) C_8dGu-AAF ; (*f*) N_7dGu-AFB_1 ; (*g*) C_8dGu-MAB.

perturbarea activității biologice. Din acest considerent, informația genetică existentă în secvența nucleotidelor din ADN nu se poate decodifica în mod normal, fiind afectată transmiterea informației genetice în succesiunea

proceselor de replicație, transcripție și translație. Leziunile macromoleculei premerg astfel apariția proceselor mutagene și/sau oncogene.

Interacțiunea ADN cu diverse molecule a făcut în ultimii ani obiectul unor investigații bazate pe modelarea matematică (31), (32), (33). Remarcabilă în acest sens este stabilirea de către Miller, în 1979 (31), a unui algoritm pentru definirea structurii, a unghiurilor conformaționale și a energiilor dependente de secvența perechilor de baze la tipul B-ADN. Ulterior, astfel de calcule au fost extinse la studiul complecșilor de intercalare ai unor compuși heterociclici cu ADN (32).

Problema carcinogenezei examinate la nivel molecular a condus la cercetări care au la bază construirea unor modele matematice pentru interpretarea relației dintre structura chimică și activitatea biologică la compușii policiclici. Astfel, Duquesne și Sallantin (33) utilizează metoda recunoașterii formelor pentru cercetarea puterii cancerigene a HPA, abordînd aspectele moleculare ale metabolizării și formării complecșilor ADN-metaboliți. Metoda se pretează pentru studiul acțiunii cancerigene a HPA, corelînd forma moleculelor cu activitatea acestora.

Structura moleculelor luate în considerare se codifică cu ajutorul unor descriptori adecvați, stabilindu-se un indice de evaluare a puterii cancerigene, bazat pe metoda recunoașterii formelor, care, comparat cu indicele experimental (biologic), evidențiază interesante similitudini.

Problema interacțiunii ADN cu diverși compuși suscită astăzi interes și pentru farmacologie. În acest sens s-au efectuat studii asupra mecanismului de acțiune a unor agenți antitumorali, între care amintim cis-diclordiaminoplatina (34), ciclofosfamida (35), (36) și antibiotice (adriamicina, daunomicina, bleomicina, mitomicina ș.a.) (37). S-a constatat că acțiunea acestora este determinată de interacțiunile ADN cu grupările devenite farmacologic active în cursul metabolizării.

Un sinoptic în problema carcinogenezei, indusă de compuși policiclici, relevă cîteva concluzii asupra etiopatogeniei :

a) Interacțiunea ADN cu hidrocarburi policiclice aromatice, acetilaminofluoren, aflatoxina B_1 și metilaminobenzen implică formarea unor aducți care, sub raport biologic, reprezintă structuri bioincompatibile interesate în denaturarea informației codificate la nivelul macromoleculei.

b) Carcinogeneza chimică, determinată de interacțiunea ADN cu compuși policiclici, evidențiază un mecanism molecular la baza căruia se află lezionarea macromoleculei polideoxiribonucleotidice.

c) Denaturarea relației structură chimică—activitate biologică la ADN, prin formarea aducților și apariția leziunilor moleculare, precedă transformarea malignă.

Într-un context mai larg se remarcă faptul că studiul mecanismelor moleculare vizînd interacțiunea ADN cu diverse molecule, discutat mai sus, interesează atît domeniul etiopatogeniei în carcinogeneza chimică, cît și chimioterapia antitumorală.

Prezentat la redacție
la 16 octombrie 1984

* *Centrul de igienă și sănătate publică, Timișoara*
** *Institutul politehnic „T. Vuia", Timișoara*
*** *Institutul de medicină Timișoara*

SOME PROBLEMS OF MOLECULAR PATHOLOGY IN CHEMICAL CARCINOGENESIS I. INTERACTION OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID WITH POLYCYCLIC COMPOUNDS

Summary

A more rigorous definition of the elements of pathogeny, characteristic of neoplasic processes, imposes a knowledge of the chemical carcinogenesis mechanisms.

The study of the interaction between deoxyribonucleic acid (DNA) and polycyclic compounds reveals the conformational modifications in the polyheteronucleotidic macromolecule, presenting an image of the biochemical lesions with implications in the molecular pathology.

From the group of polycyclic compounds with carcinogenic action there are discussed : polycyclic aromatic hydrocarbons, acetylaminofluorene, aflatoxin B_1 and aminoazobenzene, showing some aspects of their interaction with the DNA macromolecule. The adducts formed by the binding of polycyclic compounds to the purinic and pyrimidinic nitrogen bases of the DNA represent bioincompatible structures which define the molecular lesions. These, in their turn, can evolve toward neoplasic processes which affect the structural and functional integrity of the biological systems.

BIBLIOGRAFIE

1. P. D. LAWLY, *Approaches to Chemical Dosimetry in Mutagenesis and Carcinogenesis : The Relevance of Reactions of Chemical Carcinogens with DNA*, în *Chemical Carcinogens and DNA*, vol. 1, sub red. P. L. GROVER, CRC Press Inc., Boca Raton, 1979, p. 1.
2. D.S.R. SARMA, S. FAJALKSHMI, E. FARBER, *Chemical Carcinogenesis : Interaction of Carcinogens with Nucleic Acid*, în *Cancer a Comprehensive Treatise Etiology : Chemical and Physical Carcinogenesis*, sub red. F. F. BECKER, Plenum Press, New York, 1975, p. 235.
3. C.C. IRVING, Methods Cancer Res., **7**, 189 (1973).
4. J. E. TROSKO, C. C. CHANG, *Chemical Carcinogenesis as a Consequence of Alterations in the Structure and Function of DNA*, în *Chemical Carcinogens and DNA*, vol. II, sub red. P. L. GROVER, CRC Press Inc., Boca Raton, 1979, p. 181.
5. J. DELARUE, J. MIGNOT, *Conceptions actuelles de la carcinogenèse*, Rapport prèsenté au XXXVII[e] Congrès Française de Médecine, Masson et Cie, Paris, 1969, p. 1.
6. A. GRAFFI, H. BIELKA, *Problèmes de cancérologie expérimentale*, Gauthier-Villars, Paris, 1963.
7. R. VIRCHOW, *Die Cellularpathologie in ihrer Beründung auf physiologische und patologische Gewebelehre*, Berlin, 1858.
8. N. VOICULEȚ, I. NICULESCU-DUVĂZ, Oncologia, **4**, 193 (1982).
9. J. J. MULVIHILL, R. W. MILLER, J. F. FRAUMENI, *Genetics of Human Cancer*, Raven Press, New York, 1977.
10. M. ZETKIN, E. H. KÜHTZ, K. FICHTEL, *Wörterbuch der Medizin*, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1968.
11. V. SĂHLEANU, B. STUGREN, *Mică enciclopedie de biologie și medicină*, Edit. științifică și enciclopedică, București, 1976.
12. P. BAQUES, *Introduction à la médecine moléculaire*, Librairie Maloine, S.A. Paris, 1972.
13. * * * *La médecine moléculaire : Les nouvelles dimensions de la science médicale*, Gerard et Co., Verviers-Belgique, 1972.
14. M. SARAGEA, *Fiziopatologie*, vol. 1, Edit. Academiei, București, 1981, p. 87.
15. P. von SENGBUSCH, *Molekular und Zellbiologie*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1979.

16. P. BROOKES, P. D. LAWLEY, *Reaction of some mutagenic and carcinogenic compounds with nucleic acids*, în *Symposium on molecular action of mutagenic and carcinogenic agents*, Oak Ridge, 6—9 April, 1964, p. 111.
17. Z. GÂRBAN, GABRIELA DARANYI, GR. SIGARTĂU, ILEANA ATIM, *Asupra unor mecanisme moleculare admise în geneza leziunii biochimice la nivelul ADN. II. Interacțiunea ADN cu hidrocarburi policiclice aromatice*, în *Enciclopedia oncologică*, vol. 6 : *Cancerul. Oncologie comparată*, sub red. I. CHIRICUȚĂ, Edit. Inst. oncologic Cluj-Napoca și Inst. agr. Cluj-Napoca, 1981, p. 487.
18. Z. GÂRBAN, D. ȘCHIOP, GABRIELA DARANYI, DOINA POPEȚI, MARTA TĂMAȘ, RODICA MANU, *Asupra unor mecanisme moleculare admise în geneza leziunii biochimice la nivelul ADN. IV. Interacțiunea ADN cu aflatoxine*, în *Lucrări științifice — Seria medicină veterinară*, vol. XIX, Inst. agr. Timișoara, 1984, p. 138.
19. * * * *Enciclopedia oncologică*, vol. 5 : *Cancerul și mediul ambiant*, sub red. I. CHIRICUȚĂ, Edit. Inst. oncologic Cluj-Napoca și Direcția sanitară a județului Bihor, Cluj-Napoca, 1980.
20. C. P. FLESSEL, *Metals as Mutagenic Initiators of Cancer*, în *Trace Metals in Health and Disease*, sub red. N. KHARASCH, Raven Press, New York, 1979, p. 109.
21. J. D. WATSON, F. H. C. CRICK, Nature, **171**, 737 (1953).
22. S. ARNOTT, *Secondary Structure of Polynucleotides*, în *First Cleveland Symposium on Macromolecules*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1978, p. 87.
23. A. JACK, *Secondary and Tertiary Structure of Nucleic Acids, Chemistry of Macromolecules*, IIA, vol. 24, sub red. R. E. OFFORD, Univ. Park Press, Baltimore, 1979, p. 211.
24. Z. GÂRBAN, *Asociații moleculare ale acidului deoxiribonucleic cu compuși aromatici homo- și heterociclici polinucleari (implicații în eredopatologie)*, comunicare la *Al IV-lea Simpozion de embriologie și patologie prenatală*, Timișoara, 6—7 nov. 1980.
25. D. GRUNBERGER, I. B. WEINSTEIN, *Biochemical Effects of the Modification of Nucleic Acids by Certain Polycyclic Aromatic Carcinogens*, în *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, sub red. W. E. COHN, Academic Press, New York, 1979, p. 105.
26. B. PULLMAN, Int. J. Quant. Chem., **XVI**, 669 (1979).
27. G. M. SHAH, J. BHATTACHARYA, J. Biosci., **4**, 263 (1982).
28. L. A. GOLDBLATT, *Aflatoxina. Scientific Background, Control and Implication*, Academi-Press, New York, 1969.
29. G. D. STONER, B. F. DANIEL, M. KATHELEEN SCHENCK, H. A. SCHUT, Carcinocgenesis (London), **3**, 1345 (1982).
30. K. J. LIN , E. C. MILLER, Cancer Res., **35**, 844 (1975).
31. K. J. MILLER, Biopolymers, **18**, 959 (1979).
32. K. J. MILLER, M. LAUER, S. ARCHER, Int. J. Quant. Chem. Quant. Biol. Symp., **7**, 11 (1980).
33. M. DUQUESNE, J. SALLANTIN, C. R. Acad. Sci. Paris, **292**, Série III, 495 (1981).
34. T. THEOPHANIDES, Chemistry in Canada, **32**, 30 (1980).
35. H. LINDEMANN, E. HARBERS, Drug Res., **30** II, 12, 2075 (1980).
36. R. VÂLCEANU, NICOLETA VÂLCEANU, Z. GÂRBAN, I. NEDA, LIVIA VOICULESCU, DANA TÖRÖK, IULIA EREMIA, *Efectul ciclofosfamidei asupra biosintezei ADN hepatic și proteinelor serice la șobolani*, în *Enciclopedia oncologică*, vol. 6 : *Cancerul. Oncologie comparată*, sub red. I. CHIRICUȚĂ, Edit. Inst. oncologic Cluj-Napoca și Inst. agr. Cluj-Napoca, 1981, p. 412.
37. M. J. WARING, Ann. Rev. Biochem., **50**, 159 (1981).

FOCALIZAREA IZOELECTRICĂ FĂRĂ AMFOLIȚI A UNOR COMPONENTE PROTEICE ȘI ENZIMATICE DIN SEMINȚE DE *AEGILOPS sp.* ȘI *TRITICUM sp.*

IOANA HAGIMA

Rezumat. Investigațiile s-au efectuat pe semințe ale speciilor *Aegilops squarrosa* (genom DD), *Triticum durum* (genom AABB) și *T. aestivum* (genom AABBDD). S-au studiat proteinele, fosfataza acidă și peroxidaza, prin focalizarea izoelectrică fără amfoliți. Punctele izoelectrice ale celor trei genomuri caracteristice componentelor situate sînt studiate în domeniul de pH acid.

În ultima vreme, tehnicile de laborator bazate pe electroforeză se dovedesc din ce în ce mai utile în ameliorarea plantelor, datorită numeroaselor avantaje pe care le oferă. Dacă ar fi să enumerăm numai cîteva dintre ele, printre cele mai importante trebuie menționate rapiditatea, acuratețea capacitatea de caracterizare a unui soi, eficiența identificării lui, posibilitatea ca analiza să fie repetată (1). Printre aceste tehnici, un loc aparte îl ocupă focalizarea izoelectrică, tehnică caracterizată printr-o mare putere de rezoluție.

Focalizarea izoelectrică este des utilizată în studiul proteinelor din plante (2)—(4) pentru scopuri taxonomice, cum este cazul zeinei din porumb (5), pentru caracterizarea unor izoperoxidaze din porumb (6) sau pentru a fundamenta unele date genetice. Astfel, pentru grîu, această metodă s-a aplicat în analiza izoenzimelor fosfoglucomutazei, glucozo-fosfatizomerazei, α-și β-amilazei, caracterizîndu-se locii unor cromozomi (7).

Focalizarea izoelectrică reprezintă un important instrument de cercetare pentru analiza și caracterizarea proteinelor, fiind una din cele mai promițătoare metode analitice. Această metodă separă compușii pe baza diferențelor în punctele lor izoelectrice (pI), fiind superioară altor metode prin sensibilitate, rezoluție și simplitate (8).

De la introducerea sa printre metodele de analiză, această tehnică s-a perfecționat continuu, cunoscînd diferite variante, cum sînt focalizarea izoelectrică pe coloană (9) sau pe gel (10), în strat subțire cu sau fără varianta tiparului (11), ajungîndu-se recent la tehnica focalizării izoelectrice în strat ultrasubțire (12).

În lucrarea prezentă am încercat să conturăm unele caracteristici ale componentelor proteice și enzimatice din semințe prin focalizarea izoelectrică fără amfoliți. Am apelat la acest procedeu deoarece procurarea amfoliților pentru diferitele domenii de pH este costisitoare.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe semințe ale diploidului *Aegilops squarrosa*, ale tetraploidului *Triticum durum*, soiul Topaz și ale hexaploidului *T. aestivum*, soiul Iulia.

Am analizat specii de plante cu diferite grade de ploidie pentru a contura existența unor diferențe sau asemănări în ceea ce privește punctele izoelectrice ale celor trei genomuri : DD—provenit de la *Ae. squarrosa*, AABB — specific grîului *T. durum*, soiul Topaz și AABBDD — genom ce caracterizează grîul comun *T. aestivum*.

Extracția s-a realizat în apă bidistilată, raport 1 : 10 (greutate : volum); extractele s-au purificat parțial cu cărbune activ, după care s-au centrifugat la 3 000 × g, timp de 15 min.

Metoda focalizării izoelectrice fără amfoliți a fost cea descrisă de Pollack (13), cu modificarea concentrației gelului de poliacrilamidă, care în cazul nostru a fost de 5 %, și a lungimii tuburilor. Gelurile s-au ținut 30 min la preechilibrare, iar migrarea propriu-zisă a durat 16 ore, la 4°C. Voltajul aplicat inițial a fost de 180 V.

Gradientul de pH al gelului s-a determinat prin eluție și măsurarea pH-ului pentru fiecare segment de 1 cm de gel, rezultatele obținute fiind redate în figura 1.

Pentru proteine, gelurile s-au colorat în amestecul metanol 50 %, acid acetic 9 % și Coomassie Briliant Blue R-250—0,25 %. Decolorarea și fixarea s-au realizat cu acid acetic 14 %.

Pentru fosfataza acidă, vizualizarea s-a obținut incubînd gelurile la 37°C într-o soluție de naftil-fosfat de sodiu 0,04 % și Fast Garnet GBC 0,02 % în tampon acetat 0,5 M, pH 4,8. După aproximativ 20 min, zona cu activitate enzimatică a devenit brun-roșcată. Stoparea reacției și păstrarea gelurilor s-au realizat într-o soluție de acid acetic 14 % (14). Pentru peroxidază, relevarea benzilor cu activitate enzimatică s-a realizat cu reactivul cu benzidină, preparat după metoda descrisă de Bojarkin (15).

Fotografierea probelor, atît cu proteine, cît și cu cele două enzime, s-a efectuat menținînd gelurile în apă distilată.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din determinările efectuate privind activitatea fosfatazei acide din extractele purificate parțial cu cărbune am constatat că acesta reține cam 50 % din activitatea enzimatică fără modificarea spectrului enzimatic. Totuși, pentru scopurile noastre se impunea această purificare parțială, deoarece extractele brute au dat o rezoluție nesatisfăcătoare.

Focalizarea izoelectrică a proteinelor. În tabela nr. 1 redăm punctele izoelectrice pentru speciile și componentele cercetate. Astfel, proteinele aparținînd genomului DD au pI în jurul pH-ului 5,6—5,8. Proteinele din extractul de *T. durum* — genom AABB — au pI la pH-ul 5,5—5,6, iar componentele proteice din extractul de *T. aestivum* au pI la pH-ul 5,7—5,8. După cum se poate constata, pH-urile la care se găsesc pI ale proteinelor din cele trei genomuri sînt destul de apropiate, domeniul de pH 5,5—5,6 fiind chiar comun în cele trei cazuri analizate.

Tabela nr. 1

Punctele izoelectrice ale extractelor analizate

Nr. crt.	Specia analizată/genom	Componentul cercetat		
		proteine	fosfataza acidă	peroxidaza
1	*Ae. squarrosa* (DD)	5,6—5,8	5,8	4,8
2	*T. durum* (AABB)	5,5—5,6	5,2	5,7
3	*T. aestivum* (AABBDD)	5,7—5,8	5,8	5,7—5,8

În figura 1 redăm gradientul de pH al gelurilor de poliacrilamidă pe care s-au migrat extractele provenite de la cele trei specii de plante.

În figura 2 prezentăm schemele obținute după focalizarea izoelectrică fără amfoliți a extractelor parțial purificate de *Ae. squarrosa* (I), *T. durum* (II) și *T. aestivum* (III) pentru proteine (a), fosfataza acidă (b) și peroxidază (c).

Focalizarea izoelectrică fără amfoliți este inferioară ca putere de rezoluție variantei în care se folosesc amfoliții, deoarece nu redă polimorfismul proteic existent în semințe. Astfel, se citează (8) că prin utilizarea focalizării izoelectrice cu amfoliți se pot separa din bobul de grîu 20 de componenți proteici.

Focalizarea izoelectrică a fosfatazei acide. Fosfataza acidă din extractul de *Ae. squarrosa* a evidenţiat pI la pH 5,8. Enzima din extractul de *T. durum* a relevat pI la pH 5,2. Fosfataza acidă din seminţe de *T. aestivum*,

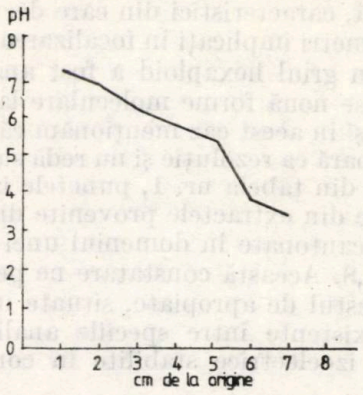


Fig. 1. — pH-ul gelurilor pe care s-au electrofocalizat extracte de seminţe aparţinînd speciilor *Aegilops squarrosa*, *Triticum durum* şi *T. aestivum*.

soiul Iulia a prezentat pI la pH 5,8, identic, după cum se poate observa, cu pI specific genomului DD. Acest lucru ne sugerează constatarea că genomul DD, component al grîului hexaploid *T. aestivum*, posesor al genomului AABBDD, îşi păstrează punctul său izoelectric şi cînd participă

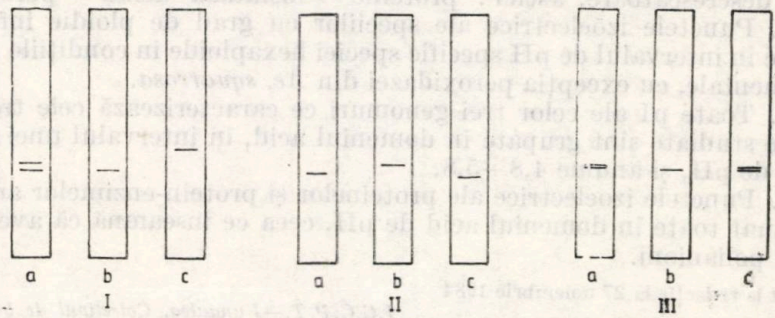


Fig. 2. — Schemele focalizării izoelectrice în gel de poliacrilamidă a extractelor parţial purificate de *Aegilops squarrosa* (I), *Triticum durum* (II) şi *T. aestivum* (III).

la configuraţia genomică specifică grîului hexaploid. Studiul fosfatazei acide din grîul hexaploid prin electroforeză în poliacrilamidă a relevat 13 componenţi enzimatici (16), evidenţiind o însemnată variabilitate, aspect pe care focalizarea izoelectrică fără amfoliţi nu l-a ilustrat.

Focalizarea izoelectrică a peroxidazei. Conturarea punctelor izoelectrice ale celor trei extracte s-a extins şi asupra unei alte enzime : o oxidoreductază — peroxidaza. Utilizînd ca substrat benzidina, rezultatele au fost următoarele : peroxidaza caracteristică genomului DD a manifestat pI la pH 4,8. Peroxidaza specifică genomului AABB a relevat pI la pH 5,7, iar enzima din extractul de *T. aestivum*, genom AABBDD, a evidenţiat pI în jurul pH-ului 5,7—5,8. Ca şi în cazul fosfatazei acide, remarcăm şi în cazul peroxidazei că punctul izoelectric al peroxidazei din genomul

AABB se regăseşte în specia hexaploidă, cu genom AABBDD. Diferenţa semnalată între cele două cazuri (la fosfataza acidă pI pentru *Ae. squarrosa* şi *T. aestivum*, la peroxidază identitate între *T. durum* şi *T. aestivum*) o atribuim caracteristicilor proprii celor două enzime : una hidrolază, cealaltă oxidoreductază, caracteristici din care decurg specificităţi diferite de substrat şi alţi parametri implicaţi în focalizarea izoelectrică.

Şi peroxidaza din grîul hexaploid a fost analizată electroforetic în gel de agar, relevîndu-se nouă forme moleculare la utilizarea guaiacolului ca substrat (17). Deci, şi în acest caz menţionăm că focalizarea izoelectrică fără amfoliţi este inferioară ca rezoluţie şi nu redă suma genomurilor.

După cum reiese din tabela nr. 1, punctele izoelectrice ale celor trei componente investigate din extractele provenite din seminţe cu trei grade diferite de ploidie sînt cantonate în domeniul unei singure unităţi de pH, şi anume între 4,8 şi 5,8. Această constatare ne permite afirmaţia că cele trei genomuri au pI destul de apropiate, situate în domeniul acid. Unele legături filogenetice existente între speciile analizate se regăsesc şi în asemănarea punctelor izoelectrice stabilite în condiţiile noastre experimentale.

CONCLUZII

1. Deşi puterea de rezoluţie a focalizării fără amfoliţi este inferioară celei obţinute cu amfoliţi, utilizarea ei oferă anumite indicaţii privind domeniul de pH în care se situează punctele izoelectrice ale unor componente.

2. Asemănarea dintre punctele izoelectrice ale celor trei extracte parţial purificate, provenite de la trei genomuri diferite, se prezintă, în ordine descrescătoare, astfel : proteine — fosfatază acidă — peroxidază.

3. Punctele izoelectrice ale speciilor cu grad de ploidie inferior se regăsesc în intervalul de pH specific speciei hexaploide în condiţiile noastre experimentale, cu excepţia peroxidazei din *Ae. squarrosa*.

4. Toate pI ale celor trei genomuri ce caracterizează cele trei componente studiate sînt grupate în domeniul acid, în intervalul unei singure unităţi de pH, şi anume 4,8—5,8.

5. Punctele izoelectrice ale proteinelor şi protein-enzimelor analizate s-au situat toate în domeniul acid de pH, ceea ce înseamnă că avem de-a face cu polianioni.

Prezentat la redacţie la 27 noiembrie 1984

I.C.C.P.T.—Fundulea, Colectivul de biochimie
71331 — Bucureşti, Bd. Mărăşti nr. 61

THE ISOELECTRIC FOCUSING WITHOUT AMPHOLYTE OF SOME PROTEIC AND ENZYMIC COMPONENTS FROM *AEGILOPS sp.* AND *TRITICUM sp.* SEEDS

Summary

The studies on seeds of species : *Aegilops squarrosa* (DD genome), *Triticum durum* (AABB genome) and *T. aestivum* (AABBDD genome) were performed ; the proteins, the acid phosphatase and the peroxidase were studied by isoelectric focusing without ampholyte. The isoelectric points of three genomes specific of studied components were ranged in acid pH domain.

BIBLIOGRAFIE

1. C. K. WAGNER, M. B. McDONALD, Seed Sci. Technol., **10**, 431 (1982).
2. P. G. RIGHETTI, A. B. BOISIO, Electrophoresis, **2**, 65 (1981).
3. O. VESTERBERG, Sci. Tools, **20**, 22 (1983).
4. D. W. MILLER, S. C. R. ELGIN, Analyt. Biochem., **60**, 142 (1974).
5. R. NUCCA, C. SOAVE, M. MOTTO, F. SALAMINI, Maydica, **23**, 239 (1978).
6. I. HAGIMA, St. cerc. biochim., **16**, 371 (1973).
7. C. C. AINSWORTH, M. D. GALE, Plant Breeding Institute — Annual Report, p. 81 (1982).
8. D. WELLNER, Analyt. Chem., **43**, 59 A (1971).
9. N. CATSIMPOOLAS, Sci. Tools, **16**, 1 (1969).
10. H. DELINCEE, B. RADOLA, Biochim. Biophys. Acta, **200**, 404 (1970).
11. H. DELINCEE, B. RADOLA, Analyt. Biochem., **48**, 536 (1972).
12. R. J. COOKE, S. R. DRAPER, J. Natn. Inst. Agric. Bot., **16**, 173 (1983).
13. S. POLLACK, Biochem. Biophys. Res. Commun., **87**, 1252 (1979).
14. I. HAGIMA, S. NICOLAE, Rev. Roum. Biochim., **18**, 21 (1981).
15. A. N. BOJARKIN, Biohimia, **16**, 352 (1951).
16. I. HAGIMA, N. N. SĂULESCU, Rev. Roum. Biochim., **19**, 209 (1982).
17. V. ALEXANDRESCU, I. HAGIMA, N. N. SĂULESCU, Rev. Roum. Biochim., **16**, 167 (1979).

STUDIUL UTILIZĂRII LUMINOLULUI CA DONOR DE ELECTRONI PENTRU DETERMINAREA ACTIVITĂȚII PEROXIDAZEI

RADU OLINESCU*, RUXANDRA ALEXANDRESCU**, STELA NIȚĂ*

Rezumat. Luminolul acționează ca donor de electroni în reacția catalizată de peroxidază, astfel că activitatea enzimei poate fi măsurată prin chemiluminescență. Reacția este complexă deoarece atît concentrațiile H_2O_2, peroxidazei și luminolului, cît și variațiile de pH modifică semnificativ intensitatea și sensul desfășurării măsurătorii (creșterea sau scăderea numărului de pulsuri). Metoda propusă are o limită de sensibilitate la 10^{-9} moli la pH 7,3. Atît peroxidaza purificată din hrean, cît și mieloperoxidaza extrasă din granulocite pot fi astfel măsurate. Chemiluminescența se datorește producerii în cursul reacției a radicalilor liberi ai luminolului și oxigenului.

Introducerea luminolului (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindionă) ca intermediar în tehnicile bazate pe chemiluminescență (CL) a permis extinderea acestei metode în multe domenii, ca toxicologie, chimie analitică, criminalistică etc. (1), (2), datorită unei mari sensibilități. Astfel, compușii conținînd gruparea hem pot fi măsurați la concentrații de 10^{-12} M, comparativ cu spectrofotometria, care detectează doar 10^{-6} M (3), (4), (5).

În sistemele studiate de mai mulți autori (3), (6), (7), peroxidaza (E.C. 1.11.1.7) era măsurată prin CL doar ca compus conținînd gruparea hem și în mediu puternic alcalin (pH 10). În aceste condiții, prezența substratului H_2O_2 nu implica activitatea enzimatică, deoarece CL observată era rezultatul alterării structurale a peroxidazei și al expunerii unor reziduuri de aminoacizi aromatici, ca triptofan și tirozină (7).

Noi am studiat condițiile utilizării luminolului ca donor de electroni în reacția catalizată de peroxidază la valori neutre de pH, în scopul folosirii CL pentru determinarea activității enzimatice.

MATERIAL ȘI METODE

S-a utilizat mai ales peroxidază extrasă și purificată din hrean (Boehringer), dar s-a testat și un preparat enzimatic extras din leucocite (8). Activitatea peroxidazei a fost măsurată pentru control și spectrofotometric utilizînd 4-aminoantipirina ca donor de electroni (9).

H_2O_2 obținut de la Merck a fost diluat corespunzător înainte de utilizare, iar concentrația a fost măsurată spectrofotometric (10).

Luminolul a fost procurat de la Merck. S-au folosit următoarele tampoane : 0,01 M fosfat de sodiu și potasiu pH 7,3, Tris-HCl 0,05 M pH 7,3 și carbonat-bicarbonat 0,05 M pH 10,0. Volumul final al amestecului de reacție a fost de 4 ml ; toate concentrațiile componenților sînt date în moli, conținuți în volumul menționat.

Chemiluminescența a fost măsurată cu un contor de scintilație lichidă Packard, tip Tricarb 460 CD, cu circuitul de coincidență neutilizat (out of coincidence), 100 % gain, ferestrele complet deschise. Se poate de asemenea utiliza și un fluorometru cu lampa de excitație oprită sau orice alt tip de contor de scintilație. CL a fost exprimată în pulsuri/minut.

REZULTATE

Efectul modificărilor de pH și cinetica reacției. Se știe că intensitatea CL produsă în reacția H_2O_2 cu compușii conținînd gruparea hem crește mult la valori alcaline de pH (3), (5), (6), indiferent de prezența luminolului. Așa cum rezultă din tabela 1, și în cazul peroxidazei intensitatea CL crește

mult la valori alcaline de pH. Dar în acest tabel se mai pot observa două efecte interesante. În primul rînd, între H_2O_2 și luminol se produce o reacție însoțită de CL de mică intensitate, care însă crește cu două ordine de mărime la valori alcaline de pH. În al doilea rînd, spre deosebire de CL

Tabela 1

Efectul modificărilor de pH asupra CL produsă în reacția catalizată de peroxidază

Nr.	Condiții experimentale	Pulsuri/minut
1	H_2O_2 + tampon fosfat	10—50
2	Luminol + tampon fosfat	10—20
3	H_2O_2 + luminol + tampon fosfat	80—120
4	H_2O_2 + tampon tris	20—40
5	H_2O_2 + luminol + tampon tris	40—60
6	H_2O_2 + luminol + tampon carbonat	10^2—10^3
7	H_2O_2 + luminol + peroxidază + tampon fosfat	10^3—10^6
8	H_2O_2 + luminol + peroxidază + tampon tris	10^2—10^5
9	H_2O_2 + luminol + peroxidază + tampon carbonat	10^5—10^6
10	Luminol + peroxidază + tampon tris	50—100

Notă. Concentrațiile H_2O_2 au fost cuprinse între 10^{-6}—10^{-3} moli, cea de luminol a fost de 1.10^{-6} moli, iar cea de peroxidază de 5.10^{-8} moli. Tampoanele au fost descrise la „Material și metode", ca și condițiile de măsurare.

modestă, observată în reacția precedentă, în prezența peroxidazei intensitatea CL crește cu două-trei ordine de mărime chiar la valori neutre de pH, cu atît mai mult la pH 10. În cazul unui mediu alcalin, diferența în intensitate a CL în absența și în prezența peroxidazei este mai mică decît la valori neutre de pH. De asemenea, se mai poate observa în tabela 1 că tamponul fosfat, la aceleași valori de pH și de concentrație, determină o intensitate mai mare a CL în reacția catalizată de peroxidază. Ținînd seama de aceste observații, devine evident avantajoasă utilizarea unei valori neutre de pH ca mediu de reacție, cu atît mai mult cu cît la valori alcaline de pH se va produce deteriorarea structurală a peroxidazei (11). De aceea, în continuare am utilizat doar tamponul Tris-HCl 0,05 M, pH 7,3.

Cinetica reacției catalizate de peroxidază este complexă, fiind influențată mult de concentrațiile componenților, atît ca intensitate a CL, cît și a sensului variației numărului de pulsuri (de scădere sau de creștere). Aceste constatări rezultă evident din datele prezentate în figura 1.

Se observă că, pentru concentrații mici de H_2O_2 (pînă la aproximativ 5.10^{-8} moli) și de peroxidază (sub 5.10^{-8} moli), se produce o creștere a numărului de pulsuri (fig. 1, *A*). În schimb, pentru concentrații mai mari decît limitele menționate, se observă o scădere a numărului de pulsuri (fig. 1, *B*). Această variație a sensului desfășurării reacției sugerează posibilitatea existenței a două reacții parțiale diferite, dar care decurg simultan.

Relații între concentrațiile substraturilor și enzimei. Ținînd seama de importanța concentrațiilor componenților reacției catalizate de peroxidază, am cercetat efectul variației fiecăruia. În primul rînd, prezentăm influența concentrației de luminol (fig. 2). Se observă astfel că variația

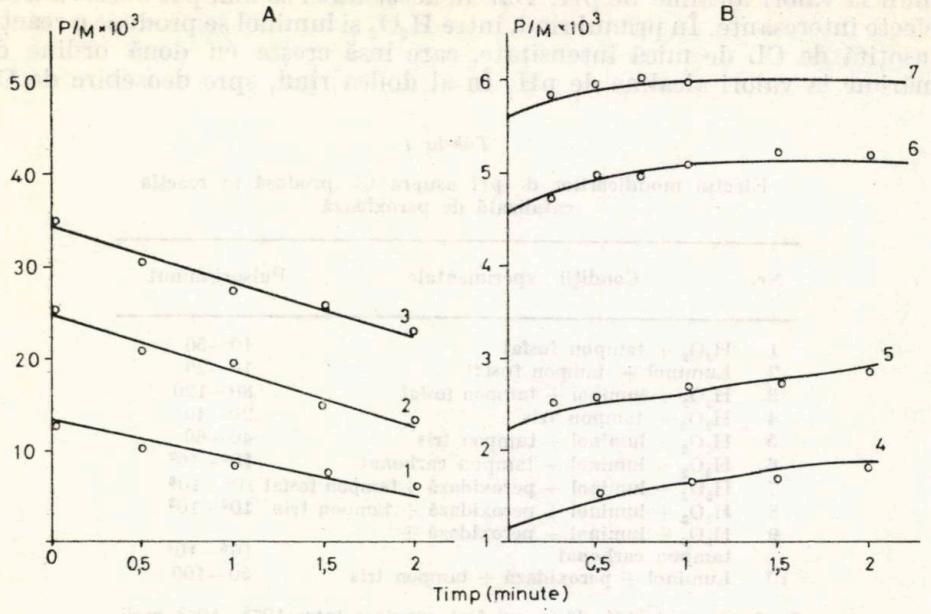


Fig. 1. — Cinetica producerii CL în reacția catalizată de peroxidază. În condițiile menționate, amestecul de reacție a fost compus din : A. peroxidază : 6.10^{-8} moli, H_2O_2 : (*1*) 5.10^{-5}, (*2*) 1.10^{-4}, (*3*) 5.10^{-4} moli ; B. peroxidază : 1.10^{-8} moli, H_2O_2 : (*4*) 1.10^{-6}, (*5*) 2.10^{-6}, (*6*) 3.10^{-6}, (*7*) 4.10^{-6} moli. În toate variantele s-au utilizat tampon tris-HCl și o concentrație constantă de luminol, 1.10^{-6} moli.

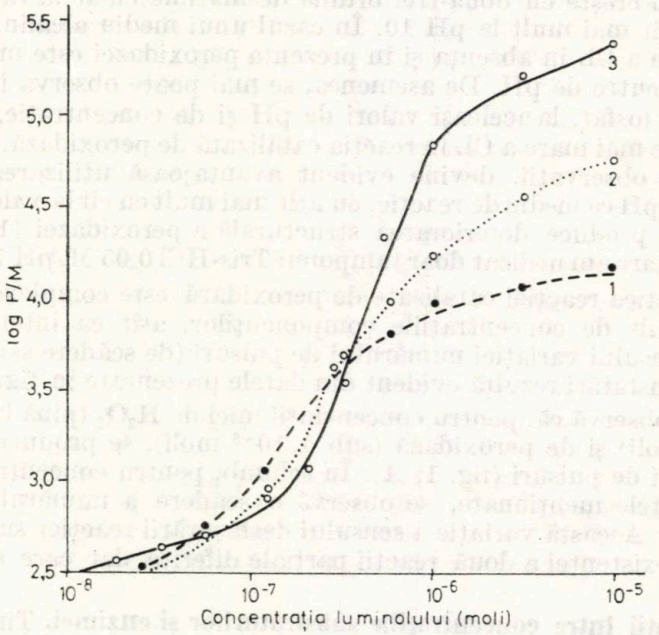


Fig. 2. — Variația CL, în funcție de concentrația luminolului, în reacția catalizată de peroxidază. Pe ordonată este trecută diferența în logaritmi a pulsurilor pe minut (P/M).

CL în funcție de concentrația luminolului cuprinde o gamă largă de aproape patru ordine de mărime, ceea ce ne-a obligat să folosim logaritmii numărului de pulsuri pe minut. În al doilea rînd, numărul de pulsuri crește odată cu concentrația luminolului după o relație neliniară, curba respectivă avînd

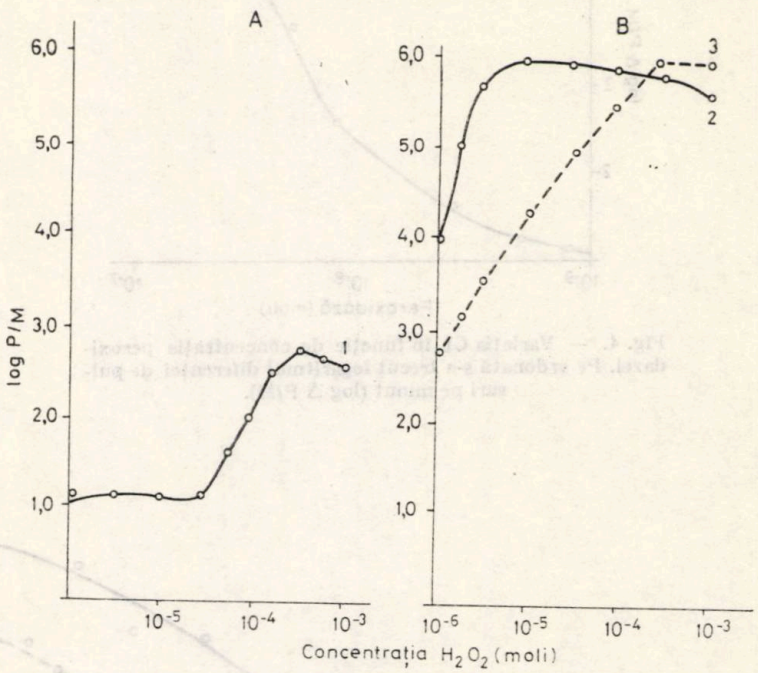


Fig. 3. — Variația CL în funcție de concentrația H_2O_2 : *A*, în absența peroxidazei (doar luminol și tampon tris) ; *B*, în prezența de (2) mieloperoxidază (20 μg proteină) și (3) peroxidază purificată, 5.10^{-8} moli.

o formă sigmoidă. Această relație este influențată de sursa și de concentrația peroxidazei numai pentru concentrații de luminol depășind 5.10^{-7} moli. De aceea, am folosit doar o singură concentrație de luminol, de 1.10^{-6} moli.

În continuare, prezentăm influența concentrației de H_2O_2 în domeniul larg de la 10^{-6} la 1.10^{-3} moli. În absența peroxidazei (fig. 3, *A*), se observă doar o creștere semnificativă a CL pentru concentrții mai mari de 5.10^{-4} moli. În schimb, în prezența peroxidazei din diferite surse, se deduce o relație aproximativ liniară, care sugerează posibilitatea folosirii unor concentrații de peroxid sub 10^{-6} moli (fig. 3, *B*). În cazul ambelor tipuri de peroxidază, notăm producerea unui platou pentru concentrații de peroxid începînd cu 10^{-4} moli.

De altfel, folosirea unor concentrații mari de peroxid trebuie evitată și din cauza CL mari, produsă și în absența peroxidazei (fig. 3, *A*).

Cea mai importantă relație este, desigur, cea dintre chemiluminescență și concentrația peroxidazei. Această corelație este prezentată în figurile 4 și 5, în care CL este exprimată fie ca logaritmul diferenței numărului de pulsuri (fig. 4), fie ca număr de pulsuri după un minut (fig. 5). Relația dintre CL și peroxidază este aproximativ liniară în cazul ambelor figuri și permite o măsurare a activității enzimei în anumite limite de concentrație : 5.10^{-5}— — 5.10^{-4} moli H_2O_2 și 10^{-9}—10^{-8} moli peroxidază.

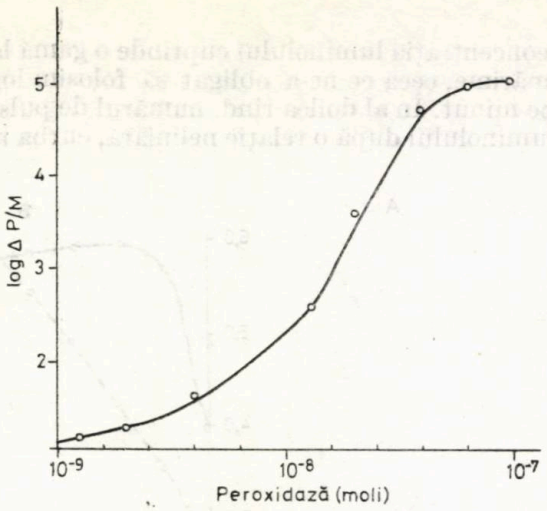


Fig. 4. — Variația CL în funcție de concentrația peroxidazei. Pe ordonată s-a trecut logaritmul diferenței de pulsuri pe minut (log Δ P/M).

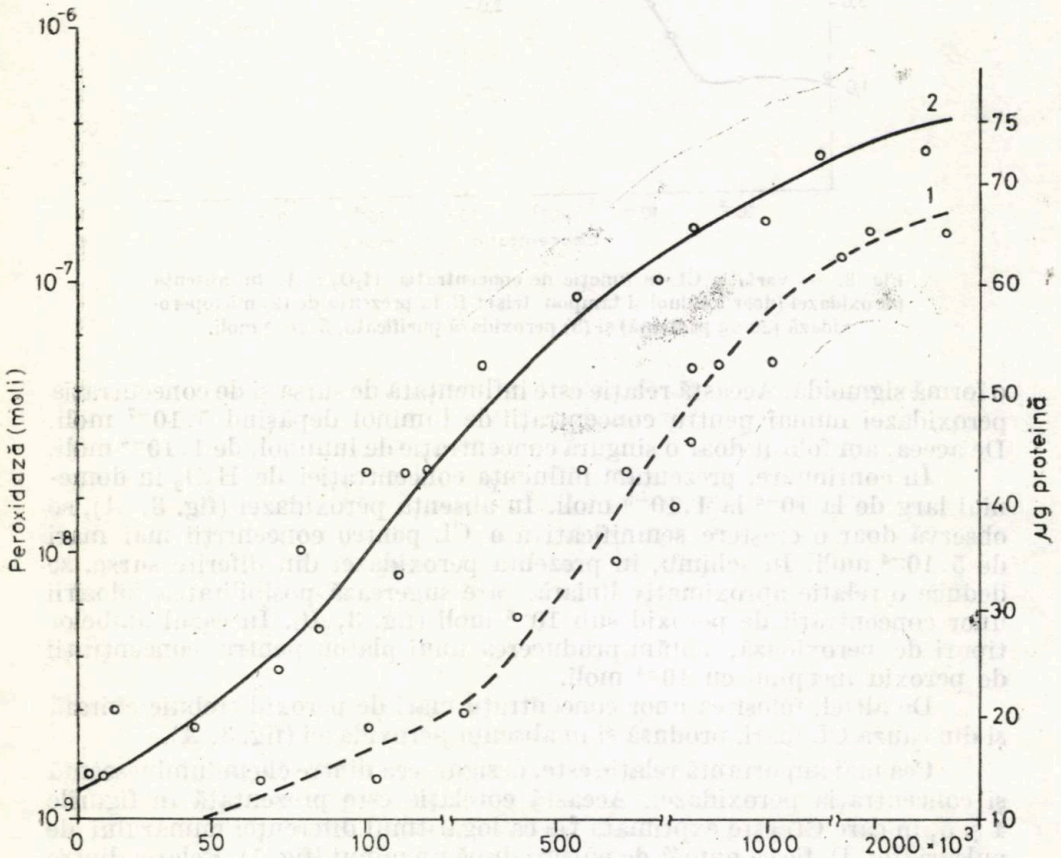


Fig. 5. — Modificarea CL în funcție de concentrația peroxidazei. Pe abscisă s-a trecut numărul de pulsuri după 90 secunde de la începutul măsurătorii și 120 secunde de la adăugarea H_2O_2. *1*, peroxidază purificată; *2*, mieloperoxidază. Pentru toate variantele s-au utilizat H_2O_2 5.10^{-5} moli, luminol 1.10^{-6} moli și tampon tris-HCl.

Rezultatele noastre arată că este posibilă măsurarea activității peroxidazei prin chemiluminescență, folosind luminolul ca donor de electroni. Măsurarea CL este foarte sensibilă la concentrații mici din componenții reacției, care în absența peroxidazei decurge foarte lent, prin numărul mic de pulsuri (tabela 1 și fig. 3). Complexitatea mare a cineticii și a relațiilor dintre CL și cele două substraturi, precum și variația sensului reacției (fig. 1) sugerează necesitatea înțelegerii mecanismului de producere a CL. Din aceste motive trebuie reamintit că însuși mecanismul general al reacției catalizate de peroxidază presupune mai multe reacții parțiale :

$$\text{Prx(peroxidază)} + H_2O_2 \rightarrow \text{Compus I} \quad (1)$$

$$\text{Compus I} + AH \rightarrow \text{Compus II} + A^- \quad (2)$$

$$\text{Compus II} + AH \rightarrow \text{Prx} + A \quad (3)$$

în care AH reprezintă donorul de electroni (9), (11).

După cercetările recente efectuate de Yamazaki și colab. (12), reacția

$$\text{Prx} + H_2O \rightarrow \text{PrxH}^+ + OH^-, \text{ iar } \text{PrxH}^+ + H_2O_2 \rightarrow \text{Compus I} \quad (4)$$

de transformare conformațională este etapa limitantă a întregului mecanism. Așa se explică influența mare a pH-ului și faptul că reducerea compusului I la II depinde de puritatea enzimei. Pe de altă parte, luminolul (LH) produce CL numai în prezența unui oxidant puternic și în mediu alcalin (1), (2), conform reacției

$$LH + 2\,OH^- + O_2 \rightarrow N_2 + 2\,H_2O + L + h\nu, \quad (5)$$

în care L este dianionul acidului aminoftalic. Potrivit datelor din tabela 1, luminolul în mediu neutru și în prezența H_2O_2 produce o CL de mică intensitate, care crește în mediu alcalin (reacția (5)). Creșterea foarte mare a CL în urma introducerii peroxidazei se datorește unei reacții asemănătoare cu (2) :

$$\text{Compus I} + LH \rightarrow \text{Compus II} + L^{\cdot -} + H_2O, \quad (6)$$

în care $L^{\cdot -}$ este un radical liber al luminolului. Desigur că mai pot interveni și alte reacții secundare :

$$\text{Compus II} + LH \rightarrow \text{Prx} + L^{\cdot -} \quad (7)$$

$$L^{\cdot -} + O_2 \rightarrow L + O_2^{\cdot -} \quad (8)$$

Radicalul $L^{\cdot -}$ a fost detectat prin rezonanță electronică de spin (13).

În final, creșterea mare a CL în prezența peroxidazei (tabela 1) se datorește suprapunerii reacțiilor parțiale (4), (5), (6), (7) și (8), deci prin producerea radicalilor liberi ai luminolului și oxigenului ($O_2^{\cdot -}$) Ca dovadă,

inhibitorii producerii radicalilor de oxigen, cum sînt benzoatul sau superoxid-dismutaza, determină o micșorare a CL. Prezența reacțiilor parțiale menționate complică mecanismul general al acțiunii peroxidazei și explică interdependența dintre concentrațiile componenților sau dificultatea stabilirii unor relații matematice.

Desigur, direcția desfășurării CL, adică creșterea temporară sau scăderea imediată a numărului de pulsuri, depinde de ponderea reacțiilor parțiale. Astfel, în figura 1, care arată cinetica reacției, se observă că scăderea numărului de pulsuri se produce în cazul concentrațiilor mari de peroxid și peroxidază, cînd apare un surplus de compus I și II, permițînd antrenarea luminolului în reacțiile (6) și (7). După cum se observă în figurile 1, 3 și 4, în această situație crește și viteza de reacție. Creșterea numărului de pulsuri (fig. 1, *A*) se produce la concentrații mici de peroxid și peroxidază, durează aproximativ 5 minute și se caracterizează printr-o viteză mică de reacție. În acest caz, probabil că această creștere se datorează reacției (8), adică formării radicalului superoxid. Această interpretare este confirmată mai ales prin datele din figura 2, care arată că, în prezența luminolului într-o concentrație suficient de mare, se produce un salt al CL și al vitezei de reacție, care apoi tinde spre plafonare datorită vitezei excesiv de mari.

Studiul întreprins permite măsurarea activității peroxidazei din diferite surse și în concentrații foarte mici, reprezentînd un avantaj față de metodele chimice (8), (9). Datorită influențelor mari ale concentrațiilor componenților, acestea trebuie standardizate, așa cum am propus anterior. Problema cea mai dificilă este cea a exprimării rezultatelor în unități de activitate. Din datele prezentate în figurile 4 și 5 se deduce că prin CL activitatea peroxidazei poate fi exprimată fie prin viteza de reacție măsurată între 30 și 90 secunde, fie direct prin numărul de pulsuri după 60 sau 90 secunde, comparînd-o apoi cu o curbă de etalonare cu peroxidază purificată. Pentru preparate parțial purificate se va raporta la 1 mg proteină.

Prezentat la redacție
la 12 septembrie 1984

* *Spitalul clinic Fundeni, București*
** *Spitalul „V. Babeș" București*

UTILIZATION OF LUMINOL AS AN ELECTRON DONOR FOR THE MEASUREMENT OF PEROXIDASE ACTIVITY

Summary

Luminol acts as an electron donor in the reaction catalysed by peroxidase, making possible the measurement of enzyme activity by chemiluminescence. The reaction is rather complex, as the concentrations of peroxidase, H_2O_2 and luminol, as the variations of pH significantly modify the intensity and the direction of the measurement (the increase or decrease of the counts number). The proposed method has a sensitivity limit of 10^{-9} moles peroxidase at pH 7.3. Both highly purified horseradish peroxidase and myeloperoxidase extracted from granulocytes might be measured by this method. The chemiluminescence produced during the activity of peroxidase is the result of the formation of luminol and oxygen free radicals. By choosing suitable concentrations of peroxidase, it is possible to measure low levels of H_2O_2 using this chemiluminescent system.

BIBLIOGRAFIE

1. U. ISACSSON, G. WETTERMARK, Analyt. Chim. Acta, **68**, 379 (1975).
2. M. A. DE LUCA, *Bioluminescence and Chemiluminescence*, Academic Press, New York, 1978.
3. H. A. NEUFELD, C. J. CONKLIN, R. D. TURNER, Analyt, Biochem., **12**, 303 (1965).
4. R. OLINESCU, S. NIȚĂ, Rev. Roum. Biochim., **14**, 43 (1977).
5. R. OLINESCU, D. CROCNAN, Rev. Roum. Biochim., **20**, 131 (1983).
6. L. EWETZ, A. THORE, Analyt. Biochem., **71**, 576 (1976).
7. H. P. MISRA, P. M. SQUITRITO, Arch. Biochem. Biophys., **215**. 59 (1982).
8. W. D. WELCH, C. W. GRAHAM, J. Reticul. Soc., **28**, 275 (1980).
9. A. C. MAEHLY, B. CHANCE, în *Methods of Biochemical Analysis*, vol. II, sub red. D. GLICK, Academic Press, New York, 1956, p. 358.
10. S. P. COLOWICK, N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, vol. II, Academic Press, New York, 1955.
11. B. C. SAUNDERS, A. G. HOWLES-SIEDLE, B. P. STARK, *Peroxidase*, Butterworth, London, 1964.
12. I. YAMAZAKI, M. TAMURO, R. NAKAJIMA, Molec. Cell Biol., **40**, 143 (1981).
13. I. YAMAZAKI, H. S. MASON, J. Biol. Chem., **235**, 2444 (1960).

MODIFICAREA INTERACȚIUNII MEDICAMENT–RECEPTOR DOPAMINERGIC DIN CREIER ÎN URMA IRADIERII „IN VIVO"

RADU OLINESCU, NORA PASCU, STELA NIȚĂ, PAULA POPA

Rezumat. Clorpromazina și rezerpina acționează asupra receptorului dopaminergic din creierul de șobolan prin inhibarea eliberării dopaminei. Amfetamina, din contră, produce o stimulare. Iradierea șobolanilor mărește cu 30 % pragul sensibilității la care acționează aceste medicamente. De asemenea, după iradiere crește calea oxidativă a catabolizării DOPA și dopaminei cu formare de adenocrom. Această oxidare este inhibată de clorpromazină și fenobarbital. Acidul ascorbic stimulează această oxidare la concentrații mici (10^{-6}—10^{-5} moli) și o inhibă la concentrații mai mari. Iradierea mărește acțiunea primelor două medicamente și abolește efectul produs de ascorbat.

Implicarea catecolaminelor și a altor neuromediatori în orice formă de stress, inclusiv iradierea, este cunoscută (1) și se datorește eliberării acestora din granulațiile existente la capetele terminale ale nervilor sau din neuroni (1), (2). Intervenția medicamentelor cu acțiune specifică asupra sistemului nervos central se produce prin acțiunea lor asupra receptorilor respectivi, declanșînd modificări biochimice cu repercusiuni asupra permeabilității de membrană, circulației sanguine, eliberării de prostaglandine etc. (2). Desigur, în urma iradierii, acțiunea acestor medicamente va avea loc pe fondul unei eliberări mari de catecolamine, care poate interfera cu efectul terapeutic. În acest sens ne-am propus studierea „in vitro" a efectului unor medicamente neurotrope asupra receptorului dopaminergic din creierul de șobolan iradiat și urmărirea eliberării specifice de dopamină marcată radioactiv. O astfel de metodă permite studiul interacțiunii medicament — receptor la nivel molecular și constituie un model modern în biochimia farmacologică (3). Concluziile practice sînt aplicabile în corectarea dozelor medicamentelor folosite, în găsirea unor noi metode eficiente de tratament sau de evitare a unor interacțiuni între medicamente etc. (2), (3).

MATERIAL ȘI METODE

Șobolani Wistar (200 ± 20 g) au fost iradiați cu radiații gamma, Co^{60}, cu o doză totală de 800 Rads. După 24 de ore au fost sacrificați împreună cu animale asemănătoare neiradiate, luate drept control. Creierii obținuți de la ambele loturi au fost împărțiți în două. O primă parte a fost tăiată în felii și utilizată pentru determinarea activității receptorului dopaminergic după metoda Creese și colab. (4), folosind (^{3}H) dopamină (Amersham -UK) și un contor de scintilație lichidă Packard. Activitatea dopaminergică este prezentată procentual; cea 100 % este obținută de la animale neiradiate și în absența oricărui medicament în condiții standardizate. A doua parte din creierii celor două loturi a fost omogenizată și utilizată pentru determinarea producerii dopacromului, după Olinescu și Niță (5). Medicamentele în stare liberă au fost procurate de la Institutul chimico-farmaceutic București și de la Fabrica „Terapia" din Cluj-Napoca.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Activitatea dopaminergică. S-au acumulat date convingătoare despre importanța dopaminei ca neurotransmițător în creier (6), (7) și privind faptul că modificările anatomice și funcționale ale receptorului dopaminergic

sînt prezente în unele boli psihice, ca Parkinson și schizofrenie. Medicamentele utilizate în aceste boli acționează asupra acestui receptor, determinînd în primul rînd variația eliberării de dopamină. În acest sens prezentăm în figura 1 modificările activității receptorului dopaminergic (deci

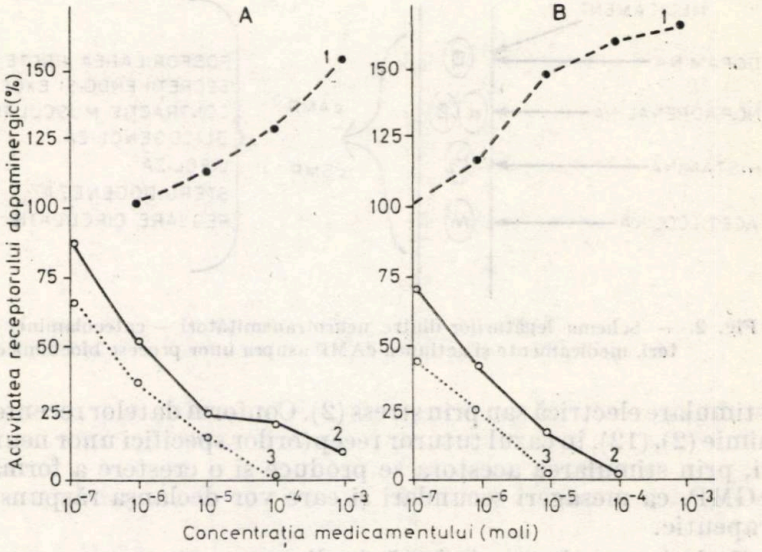


Fig. 1. — Modificarea activității receptorului dopaminergic din creier de șobolani neiradiați (A) și iradiați (B) de către medicamente neurotrope într-o gamă largă de concentrații : *1*, amfetamină ; *2*, clorpromazină ; *3*, rezerpină. Modificările au rezultat după 30 min de incubare în condițiile descrise de Creese și colab. (4).

ale eliberării de dopamină) în prezența unor medicamente neurotrope. În cazul animalelor neiradiate se observă că, în timp ce amfetamina crește eliberarea de dopamină marcată, clorpromazina (CPZ) și rezerpina o micșorează. Amfetamina produce o acțiune semnificativă începînd cu 10^{-5} moli, dar CPZ și rezerpina inhibă chiar de la 10^{-7} moli, ajungînd la o completă blocare la 10^{-7} moli. Aceste date confirmă rezultatele asemănătoare obținute anterior (6), (8), (9). În urma iradierii, modificările cele mai semnificative se observă în cazul amfetaminei, unde efectul stimulator crește, pragul sensibilității ajungînd la 10^{-6} moli, iar acțiunea maximă la 10^{-4} moli. Această creștere a sensibilității după iradiere se constată și pentru medicamentele care blochează eliberarea de dopamină. Această creștere poate fi estimată „in vivo" cu aproximativ 30 % și sugerează o micșorare a dozelor administrate. Modificarea sensibilității receptorului dopaminergic după iradiere este posibilă datorită schimbărilor calitative produse în structura secundară și terțiară a proteinelor, intervenind o „rigidizare" conformațională, care favorizează legarea unei cantități mai mari de medicament de receptor (10).

Lucrări relativ recente (6), (11) au dovedit prezența în componența receptorului dopaminergic a unei adenilatciclaze-dopamin-dependente, deosebit de abundentă în unele regiuni ale creierului, cum sînt nucleii caudați și substanța neagră. În urma activării receptorului dopaminergic va crește

eliberarea dopaminei, dar și formarea de adenozinmonofosfat ciclic (cAMP) (2), (6), (7). Activitatea adenilatciclazei și concentrația cAMP sînt deosebit de mari în creier comparativ cu alte organe (6). Formarea crescută de cAMP în creier poate fi realizată nespecific printr-o varietate de medicamente,

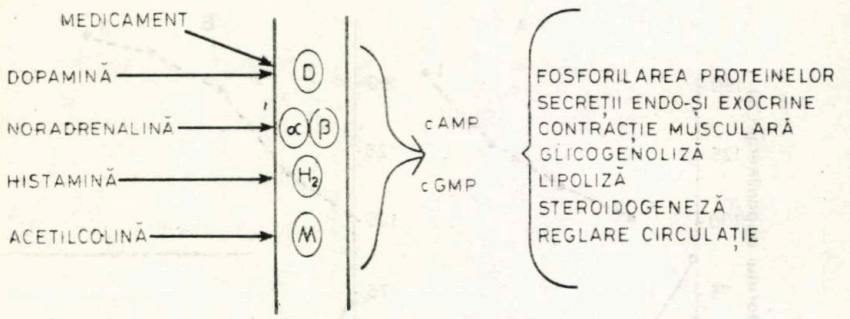


Fig. 2. — Schema legăturilor dintre neurotransmițători — catecolamine, receptori, medicamente și acțiunea cAMP asupra unor procese biochimice.

prin stimulare electrică sau prin stress (2). Conform datelor recente de neurobiochimie (2), (12), în cazul tuturor receptorilor specifici unor neurotransmițători, prin stimularea acestora se produce și o creștere a formării cAMP sau cGMP, ca mesageri secundari și care vor declanșa răspunsul biologic și terapeutic.

Trebuie menționat că după iradiere s-a constatat o creștere marcată și de lungă durată a concentrației cAMP în creier (13), aparent nelegată de doza de iradiere, deci legată de creșterea nespecifică a catecolaminelor, ca răspuns al reactivității organismului la orice stress (1).

Deosebit de interesantă este observația lui Hess și Prasad (14), după care creșterea formării cAMP pare să fie un factor al rezistenței organismului la iradiere. De altfel, radioprotectorii utilizați ce conțin grupări sulfhidril produc „in vivo" o creștere a formării cAMP. Faptul că mărirea concentrației cAMP protejează numai celulele normale, dar nu și pe cele tumorale (14), deschide o nouă direcție importantă de cercetare.

Oxidarea L-DOPA. După cum se observă în figura 3, atît L-DOPA (dihidroxifenilalanină), cît și dopamina sînt implicate în multiple reacții catabolice, cu pondere variabilă în funcție de organ și de starea fiziopatologică (2). Mai puțin cunoscută este calea oxidativă, comună atît DOPA, cît și dopaminei, care duce la formarea pigmentului melanină, avînd drept intermediar dopacromul (2), (5), (15). În această cale oxidativă par să fie implicate atît sistemul xantină—xantinoxidază (5), cît și o peroxidază, asemănătoare, după unele proprietăți, cu tirozinaza (16). Oricum, după cum s-a arătat anterior (5), (16), există o legătură inversă între formarea dopacromului și nivelul grupărilor sulfhidril libere proteice, deoarece producerea formei chinonice a catecolaminelor are loc după oxidarea grupărilor SH proteice (5), care au rol protector (17).

După cum se observă în figura 4, medicamentele studiate inhibă formarea dopacromului, mai ales la concentrații relativ mari. În timp ce CPZ și mai puțin fenobarbitalul inhibă oxidarea DOPA exogene, chiar la 10^{-5} moli, și, respectiv, 10^{-4} moli, ascorbatul, din contră, stimulează această oxidare la concentrații mici (10^{-6} moli) și inhibă la cantitate mai

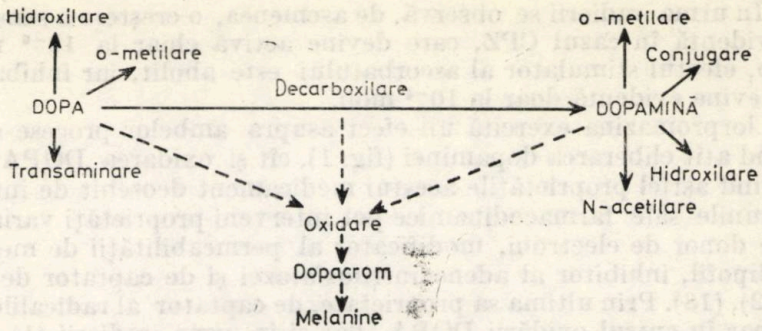
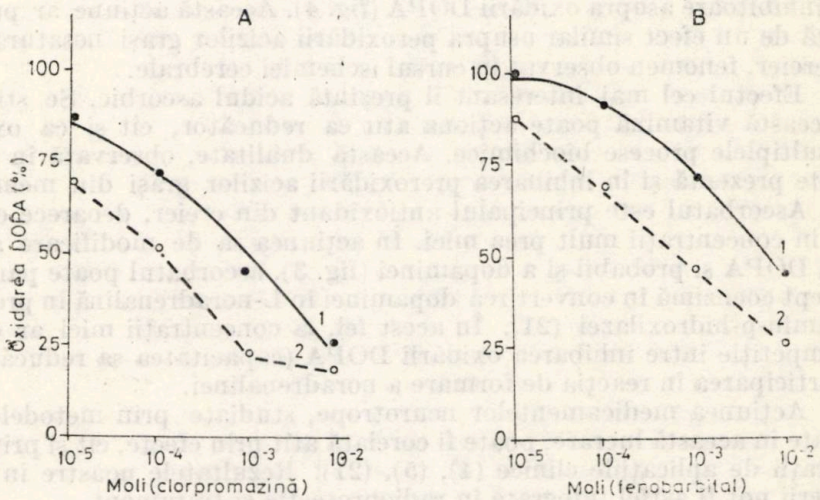


Fig. 3. — Schema reacțiilor catabolice în care sînt implicate DOPA și dopamina. Liniile îngroșate indică o pondere mai mare a reacțiilor respective.



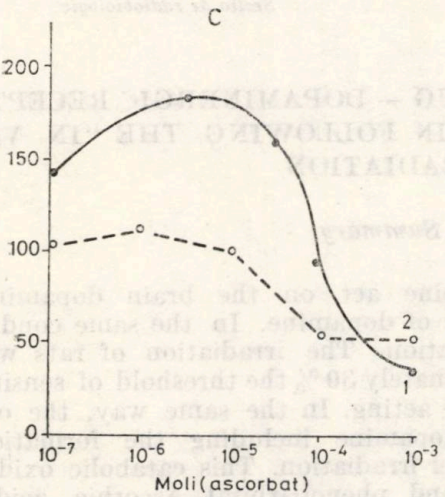


Fig. 4. — Modificarea oxidării L-DOPA, adăugată (3.10^{-3} moli) sistemului de reacție ce cuprinde omogenat de creier (5), de către medicamente într-o gamă largă de concentrații : *A*, clorpromazină ; *B*, fenobarbital ; *C*, ascorbat. S-au utilizat omogenate cu conținut echivalent proteic provenite de la șobolani neiradiați (1) și iradiați (2).

mare. În urma iradierii se observă, de asemenea, o creștere a sensibilității mai evidentă în cazul CPZ, care devine activă chiar la 10^{-6} moli. În schimb, efectul stimulator al ascorbatului este abolit, iar inhibarea oxidării devine evidentă doar la 10^{-4} moli.

Clorpromazina exercită un efect asupra ambelor procese studiate, inhibînd atît eliberarea dopaminei (fig. 1), cît și oxidarea DOPA (fig. 4), subliniind astfel proprietățile acestui medicament deosebit de interesant. În acțiunile sale farmacodinamice pot interveni proprietăți variate, cum sînt de donor de electroni, modificator al permeabilității de membrană, agent lipofil, inhibitor al adenozintrifosfatazei și de captator de radicali liberi (2), (18). Prin ultima sa proprietate, de captator al radicalilor liberi, care apar în cursul oxidării DOPA, dar și în urma iradierii (1), (2), (5), CPZ prezintă calități de radioprotector.

Fenobarbitalul este un cunoscut medicament barbituric și inductor al sistemului hidroxilant microzomial hepatic, exercitînd o acțiune moderat inhibitoare asupra oxidării DOPA (fig. 4). Această acțiune ar putea fi legată de un efect similar asupra peroxidării acizilor grași nesaturați(19) din creier, fenomen observat în cursul ischemiei cerebrale.

Efectul cel mai interesant îl prezintă acidul ascorbic. Se știe (20) că această vitamină poate acționa atît ca reducător, cît și ca oxidant în multiplele procese biochimice. Această dualitate, observată în figura 4, este prezentă și în inhibarea preroxidării acizilor grași din membrane (20). Ascorbatul este principalul antioxidant din creier, deoarece ceilalți sînt în concentrații mult prea mici. În acțiunea sa de modificare a oxidării DOPA și probabil și a dopaminei (fig. 3), ascorbatul poate participa și drept coenzimă în convertirea dopaminei în L-noradrenalină în prezența dopamin-p-hidroxilazei (21). În acest fel, la concentrații mici ar exista o competiție între inhibarea oxidării DOPA (capacitatea sa reducătoare) și participarea în reacția de formare a noradrenalinei.

Acțiunea medicamentelor neurotrope, studiate prin metodele prezentate în această lucrare, poate fi corelată atît prin efecte, cît și prin concentrații de aplicațiile clinice (4), (5), (21). Rezultatele noastre în cazul iradierii pot fi astfel integrate în radioprotecție și tratament.

Prezentat la redacție
la 21 septembrie 1984

Spitalul clinic Fundeni, București,
Secția de radiobiologie

MODIFICATON OF THE DRUG — DOPAMINERGIC RECEPTOR INTERACTION IN THE BRAIN FOLLOWING THE "IN VIVO" IRRADIATION

Summary

Chlorpromazine and reserpine act on the brain dopaminergic receptor by inhibiting the release of dopamine. In the same conditions amphetamine produces a stimulation. The irradiation of rats with a lethal dose increases with approximately 30 % the threshold of sensitivity at which the mentioned drugs are acting. In the same way, the oxidative pathway of DOPA and dopamine including the formation of adenochrome is also increased after irradiation. This catabolic oxidation is inhibited by chlorpromazine and phenobarbital. Ascorbic acid sti-

mulates this oxidation in a low range of concentrations (10^{-6}—10^{-5} mole) and inhibits it in higher concentrations. The irradiation increases the action of the first two drugs and abolishes the effect produced by ascorbate. The results are discussed in connection with the concomitant increased formation of cyclic AMP and the radiosensitivity.

BIBLIOGRAFIE

1. Z. DEANOVIC, *Biochemical Indicators of Radiation Injury in Man*, IAEA Vienna, 1971, p. 113.
2. V. VOICU, R. OLINESCU, *Mecanisme enzimatice în farmacodinamie*, Edit. ştiinţifică şi enciclopedică, Bucureşti, 1977.
3. S. POP, B. CUPARENCU, T. BÎRZU, *Receptori farmacologici*, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1977.
4. I. CREASE, D. R. BERT, S. H. SNYDER, Science, **192**, 481 (1976).
5. R. OLINESCU, S. NIŢĂ, Rev. Roum. Biochim., **14**, 263 (1977).
6. L. L. IVERSEN, Science, **188**, 1084 (1975).
7. E. USDIN, S. H. SNYDER, *Frontiers in Catecholamine Research*, Pergamon Press, New York, 1973.
8. P. SEEMAN, T. LEE, Science, **188**, 1217 (1975).
9. C. PARDEN, C. WILSON, P. GROSS, Life Sci., **19**, 1499 (1976).
10. R. OLINESCU, A. VIŞINESCU, Rev. Roum. Biochim., **9**, 243 (1972).
11. Y. C. CORMIER, R. J. GEORGE, J. Neurochem., **32**, 1061 (1979).
12. T. BARTFAI, Trend Biochem. Sci., **6**, 121 (1978).
13. E. PĂUŞESCU, M. POPESCU, Strahlentherapie, **151**, 165 (1976).
14. D. HESS, K. PRASAD, Life Sci., **29**, 1 (1981).
15. A. M. KORNER, J. M. PAVELEK, J. Investig. Dermatol., **75**, 192 (1980).
16. M. R. OKUN, R. P. PATEL, Pigment Cell, **3**, 89 (1976).
17. H. S. MAKER, D. J. SILIDES, G. COHEN, J. Neurochem., **36**, 589 (1981).
18. R. OLINESCU, N. PASCU, Rev. Roum. Biochim., **19**, 49 (1982).
19. D. S. SMITH, B. K. SIESJO, S. REGHNCRONA, Anesthiology, **53**, 186 (1980).
20. R. OLINESCU, *Peroxidarea în chimie, biologie şi medicină*, Edit. ştiinţifică şi enciclopedică, Bucureşti, 1982.
21. E. J. DILIBERTO, P. L. ALLEN, J. Biol. Chem., **256**, 3385 (1981).

INTERACȚIUNEA DINTRE CÎMPUL ELECTROMAGNETIC DE ÎNALTĂ FRECVENȚĂ ȘI ACTIVITATEA LACTATDEHIDROGENAZEI

T. POPESCU*, LILIANA PÂSLARU**, ROXANA VASILCO**, TATIANA ONISEI*, SORIN COMOROȘAN**

Rezumat. Determinările au avut ca scop urmărirea comportamentului lactatdehidrogenazei (LDH) în cîmp electromagnetic de înaltă frecvență. S-a lucrat cu un C.E.M. de frecvența de 500 MHz, aplicat direct în cuva de reacție, obținîndu-se un cîmp uniform în tot volumul cuvei. Ținîndu-se seama de toți factorii suplimentari care ar fi putut influența cinetica reacției piruvat $\xrightarrow{LDH}$ lactat, s-a observat o mărire a vitezei de reacție în C.E.M. de înaltă frecvență.

Lucrarea urmărește studiul comportării reacției LDH, în sensul piruvat → lactat, în cîmp electromagnetic (C.E.M.) de înaltă frecvență (10^8 Hz).

S-a avut în vedere modificarea cineticii enzimatice datorate atît influenței directe a cîmpului asupra dipolilor și sarcinilor legate, cît și creșterii temperaturii în timpul reacției.

Cîmpul electromagnetic pune în stare de vibrație sarcinile libere și duce la creșterea frecvenței ciocnirilor și a energiei cinetice a moleculelor și ionilor aflați în impact. Aceasta provoacă creșterea energiei cinetice interne a mișcării dezordonate și implicit creșterea temperaturii.

Pe de altă parte, C.E.M. din acest domeniu de frecvență poate favoriza, prin influența sa asupra dipolilor moleculari, formarea complexului enzimă—substrat și chiar trecerea moleculelor de enzimă în stare excitată, fenomene ce provoacă creșterea vitezei de reacție.

Forțele implicate în formarea complexului enzimă—substrat presupun implicarea tuturor tipurilor de interacțiuni: covalente, electrostatice și de dispersie.

Aceste interacțiuni, ca și procesele de transfer ale protonilor, semnificative în cataliza enzimatică, pot suferi modificări sub acțiunea cîmpului electromagnetic.

Forțele susceptibile sînt, din acest punct de vedere, legăturile de hidrogen, cu două sau trei ordine de mărime mai slabe decît cele covalente, dar a căror energie este sensibil influențată de modificarea distanțelor interatomice sau a proprietăților dielectrice ale mediului (1).

Din acest punct de vedere, proprietățile dielectrice ale mediului, respectiv ale apei, sînt afectate de prezența C.E.M.

În lumina modelului vibrațional al lui Fröhlich (2) privind desfășurarea reacțiilor enzimatice, se poate presupune că prezența C.E.M. produce perturbații în sistemul oscilatorilor cuplați (imaginați de autor), ducînd în final la modificarea ratei de reacție. Trebuie însă subliniat faptul că domeniul de frecvență la care s-a lucrat este cu aproape trei ordine sub valoarea frecvenței prezise în teoria lui Fröhlich.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a utilizat un generator de înaltă frecvență cu domeniul (1 G Hz+300 MHz) la puterea de aproximativ 5 W, tip Vebrafenawerke.

Pentru a crea cîmp în cuva spectrofotometrului, în care s-a urmărit cinetica enzimatică, s-a utilizat o montură bine ecranată, în care mediul activ a fost excitat cu o buclă de simetrizare,

în conformitate cu figurile 1 şi 2. S-a întrebuinţat un cablu ecranat, cu ecranul din Cu, cu lungimea minimă posibilă. Pentru urmărirea reacţiei, s-a folosit un spectrofotometru Spekol 20, a cărui cuvă a fost termostatată la 25°C, cu un ultratermostat. Montura cuvei şi sistemul de excitare au fost concepute astfel încît s-au eliminat orice perturbaţii ale electronicii spectrofotometrului, provocate de cimp.

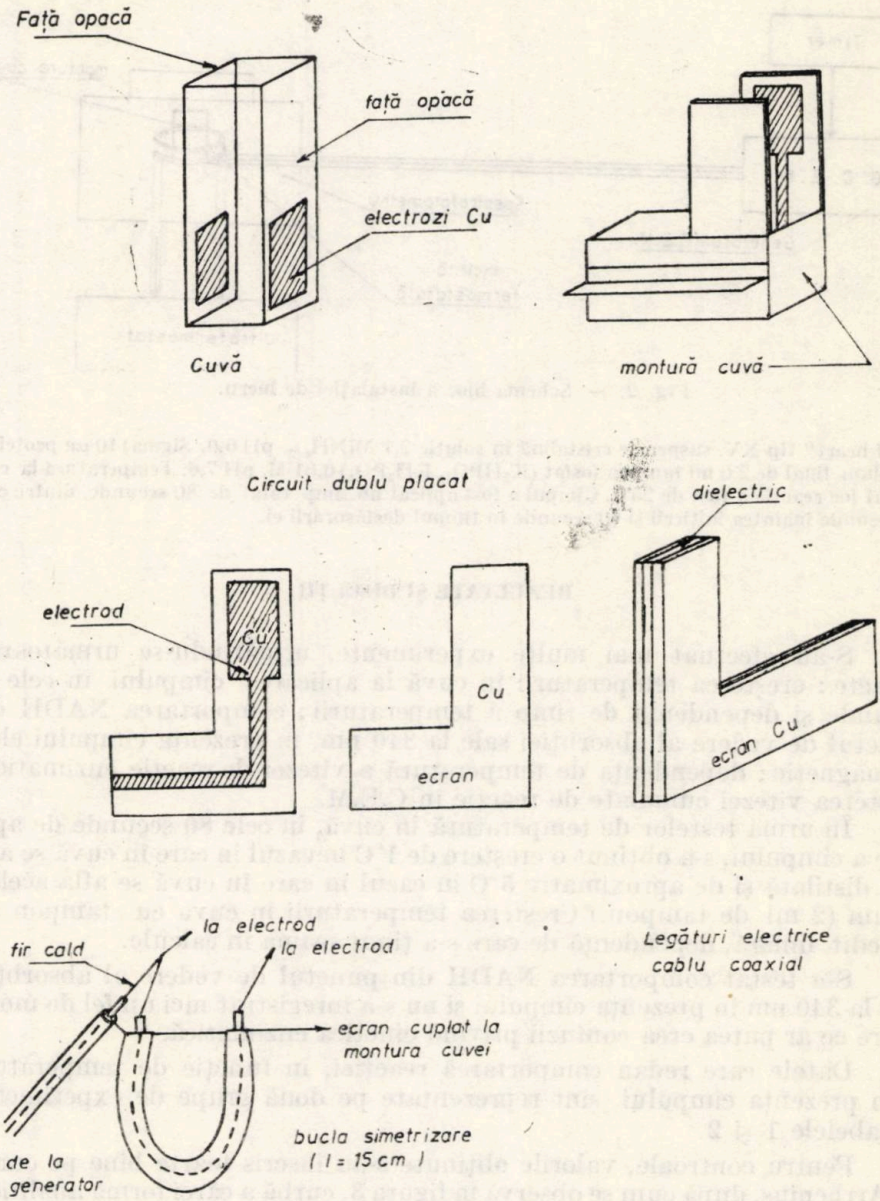


Fig. 1. — Schiţă montură cuvă.

S-a lucrat la o frecvenţă de 500 MHz, la care s-a adaptat rezonant circuitul de excitaţie, obţinîndu-se transfer maxim de energie.

S-a baleiat doar o zonă limitată de frecvenţe în testele preliminare, constatîndu-se că, într-un interval de aproximativ 100 MHz, efectul este independent de frecvenţă.

S-a întrebuințat o cuvă de plastic de 4 ml, pe ai cărei pereți laterali s-au aplicat, prin lipire, doi electrozi din tablă de Cu de 0,05 mm, creîndu-se astfel un cîmp uniform în tot volumul cuvei.

Reacția enzimatică a conținut următorii reactivi : piruvat de sodiu („dimer free", Merck) 240 μg, B-NADH (sare disodică, formă redusă, Sigma) 350 μg, LDH (preparat comercial,

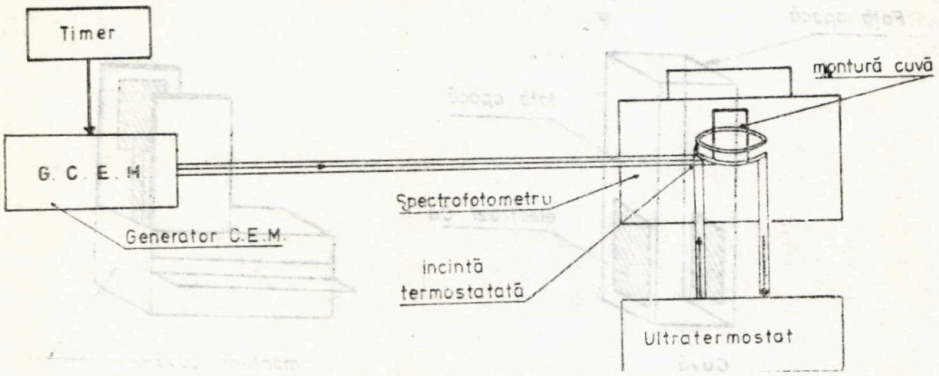


Fig. 2. — Schema bloc a instalației de lucru.

„beef heart" tip XV, suspensie cristalină în soluție 2,1 M$(NH_4)_2$, pH 6,0, Sigma) 10 μg proteină, în volum final de 2,0 ml tampon fosfat (K_2HPO_4, KH_2PO_4) 0,01 M, pH 7,6. Temperatura la care a avut loc reacția a fost de 25°C. Cîmpul a fost aplicat un timp total de 80 secunde, dintre care 20 secunde înaintea inițierii și 60 secunde în timpul desfășurării ei.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

S-au efectuat mai multe experimente, urmărindu-se următoarele aspecte : creșterea temperaturii în cuvă la aplicarea cîmpului în cele 80 secunde și dependența de timp a temperaturii ; comportarea NADH din punctul de vedere al absorbției sale la 340 nm, în prezența cîmpului electromagnetic ; dependența de temperatură a vitezei de reacție enzimatică ; creșterea vitezei cumulate de reacție în C.E.M.

În urma testelor de temperatură în cuvă, în cele 80 secunde de aplicare a cîmpului, s-a obținut o creștere de 1°C în cazul în care în cuvă se afla apă distilată și de aproximativ 5°C în cazul în care în cuvă se afla același volum (2 ml de tampon.) Creșterea temperaturii în cuva cu tampon s-a dovedit liniară, dependență de care s-a ținut seama în calcule.

S-a testat comportarea NADH din punctul de vedere al absorbției sale la 340 nm în prezența cîmpului și nu s-a înregistrat nici un fel de modificare ce ar putea crea confuzii privind cinetica enzimatică.

Datele care redau comportarea reacției, în funcție de temperatură și în prezența cîmpului, sînt reprezentate pe două grupe de experimente în tabelele 1 și 2.

Pentru controale, valorile obținute s-au înscris foarte bine pe curba lui Arrhenius, după cum se observă în figura 3, curbă a cărei formă analitică, exponențială este :

$$K = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}, \tag{1}$$

unde K este constanta de reacție, iar E_a energia de activare a LDH.

Tabela 1

Comportarea reacției enzimatice în funcție de temperatură și în prezența cîmpului electromagnetic (grupul de experiențe nr. 1)

Experiența	Temperatura	Media controalelor la un minut	N_t	N^+	$N^+ - N_t$
1	25°C	439	480	530	50
2	23,5°C	281	327	433	106
3	25°C	322	388	433	45
	29°C	388			
4	26°C	269,5	392	465	73
	28°C	345			
	30°C	412			
5	24,6°C	262			
	27°C	332	348	395	47
	29,5°C	412			
	30,3°C	435			
6	25°C	320			
	27,4°C	341			
	29°C	429	405	457	52
	30°C	484			

Notă. N_t = valoarea calculată a ratei cumulate la 60 secunde.
N^+ = valoarea ratei cumulate la 60 secunde în prezența C.E.M.

Tabela 2

Datele primare ale grupului de experimente nr. 2

Comportarea controalelor în funcție de temperatură				Comportarea reacției în C.E.M. N				
Absorbția inițială	Dinamica absorbției la intervale de 15 s.	Rata cumulată de reacție la 15 s	Rata de reacție	Absorbția inițială	Dinamica absorbției la intervale de 15 s.	Rata cumulată de reacție la 15 s.	Rata de reacție	N_t
0,862	*25°C*							
	0,768	0,074		0,875	0,760	0,115		
	686	176	102		636	239	124	
	604	258	92		517	350	119	
	544	318	60		418	457	99	
0,893	0,801	0,092						
	720	173	81					
	638	255	82					
	571	322	67					
	28°C							
0,829	0,716	0,113	125	0,883	0,769	0,144		405
	591	238	86		644	239	95	
	505	324	80		523	360	121	
	425	404			435	447	87	
	29°C							
0,860	0,737	0,123						
	611	249	126					
	518	342	93					
	431	429	87					
	30°C							
0,864	0,722	0,145						
	598	269	124					
	480	387	118					
	383	484	97					

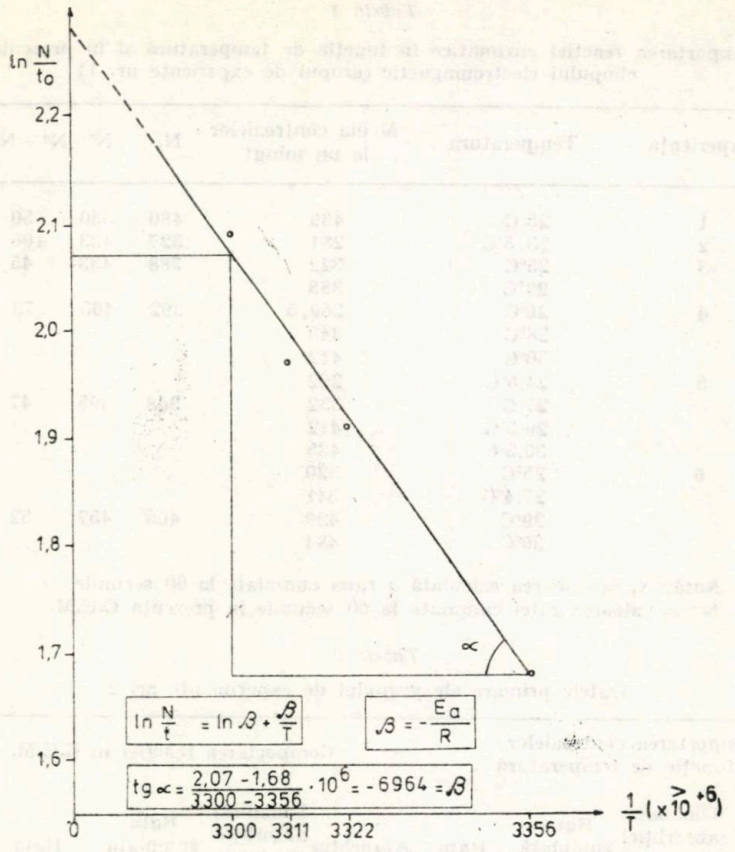


Fig. 3. — Determinarea grafică a energiei de activare.

Pentru a lucra în termeni de viteză de reacţie, s-a introdus o constantă B :

$$B = e \cdot s \cdot A,$$

unde e şi s sînt, respectiv, concentraţiile enzimei şi ale substratului.

În aceste condiţii :

$$\frac{N}{t} = B \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}, \tag{2}$$

unde $\frac{N}{t}$ este viteza de reacţie în unităţi de absorbţie/secundă.

Pentru ultimul experiment (comentat) s-a găsit $\frac{E_a}{R} = 6964$ kmol^{-1} K^{-1} şi $B = 7{,}569329 \cdot 10^{10}$, aşa cum rezultă din figura 3.

Utilizînd ecuaţia a doua şi valorile determinate pentru $\frac{E_a}{R}$ şi B, s-a calculat valoarea vitezei de reacţie cumulate, la 60 secunde. În calcule s-a

luat in considerație creșterea liniară a temperaturii în timp de 80 secunde de la 25°C — temperatura inițială — la 30°C.

S-a utilizat ecuația :

$$n = \frac{N}{t} = B \cdot e^{-\frac{Ea}{R(T_0' + \alpha \cdot t)}}, \tag{3}$$

de unde valoarea N_t este :

$$n_t = B \cdot \int_0^{t_1} e^{-\frac{Ea}{R(T_0' + \alpha \cdot t)}} \cdot dt, \tag{4}$$

unde $\alpha = 0{,}0625$ K/s, N_t rata cumulată, calculată la 60 secunde, iar T_0' temperatura în cuvă după 20 secunde de la aplicarea cîmpului :

$$T_0' = T_0 + 1{,}25, \tag{5}$$

unde T_0 este temperatura inițială în cuvă, stabilită cu ajutorul termostatului.

Efectuînd în (4) schimbarea de variabilă :

$$-\frac{E_a}{R(T_0' + \alpha t)} = u, \tag{6}$$

se ajunge la o integrală de forma :

$$\int \frac{e^u}{u^2} \cdot du \tag{7}$$

a cărei primitivă este :

$$\int \frac{e^u}{u^2} \cdot du = -\frac{e^u}{u} + \ln|u| + \frac{u}{1 \cdot 1!} + \frac{u^2}{2 \cdot 2!} + \ldots\ldots + \frac{u^n}{n \cdot n!} \tag{8}$$

Calculul seriei de puteri este laborios. S-a recurs la calculul numeric al integralei, utilizînd un minicalculator programabil Hewlett Packard 38, al cărui program în limbaj specific („basic" simplificat) este prezentat în tabela 3.

În urma testelor ne-am oprit la o cuadratură de 600 de pași de 0,1 secunde. Rezultatul obținut din calcul, notat cu N_t, se află în tabela 2.

Utilizînd valoarea energiei de activare determinate, s-a procedat analog și în cazul primelor cinci experimente, datele obținute fiind reprezentate în tabela 1.

Comparînd valoarea teoretică N_t a ratei cumulate cu cea obținută experimental în cazul aplicării cîmpului, se observă că în toate cazurile $N^+ > N_t$. Variațiile de temperatură fiind identice, aceasta ne îndreptă-

ţeşte să presupunem că influenţa C.E.M. este directă şi nu doar prin efectul datorat creşterii temperaturii.

Pe de altă parte, după cum se observă din tabela 2, vitezele de reacţie ale controlului de la 30°C şi primului iradiat au valori foarte asemănătoare.

Tabela 3

Program de calcul pentru integrarea numerică a funcţiei $N^* = \beta \int e^{\frac{\beta}{T+\alpha t}} \cdot dt$

$\beta = -6964$ STO O.

$\beta' = 0{,}7569329 \cdot 10^{10}$ STO 7

$T_0' = 298 + 1{,}25 = 299{,}25$ K STO 2

$\alpha = 0{,}0625$ STO 3

Pasul=0,1 STO 9

Iniţializare 0.00 STO 1, 4, 5, 6

01	RCL 9	25	g GTO 03
02	STO 4	26	RCL 1
03	RCL 4	27	R/S
04	RCL 3		
05	$\overline{\times}$		
06	RCL 2		
07	$\overline{+}$		
08	STO 5		
09	RCL 0		
10	RCL 5		
11	$\overline{\div}$		
12	g e*		
13	RCL 7		
14	$\overline{\times}$		
15	STO 6		
16	RCL 6		
17	STO + 1		
18	RCL 1		
19	RCL 9		
20	ENT		
21	STO + 4		
22	RCL 8		
23	RCL 4		
24	g $x \leqslant y$		

Aspectul acesta este surprinzător. Creşterea temperaturii reacţiei, în cazul iradiatului, ar trebui să genereze o altă comportare a ratelor reacţiei decît în cazul controlului la temperatură constantă. Rezultă de aici încă un argument în favoarea afirmaţiei că mărirea vitezei de reacţie este mai curînd un efect al cîmpului decît al creşterii temperaturii. Acesta este, la rîndul său, modul de manifestare al căldurii rezultate din degradarea energiei cîmpului electromagnetic, degradare ce se produce trecînd prin faza intermediară de energie mecanică.

Urmărind rezultatele testului de creştere a temperaturii în cuvă, sub acţiunea cîmpului, în cazul apei distilate şi al tamponului, se conturează concluzia că ridicarea temperaturii acestuia din urmă este efectul transferului continuu de energie cinetică de la ionii aflaţi în mişcare oscilatorie către

celelalte particule din mediu. În aceste condiții, la introducerea enzimei și a substratului, sarcinile legate de porțiunile lor hidrofile vor intra în mișcare oscilatorie, pe de o parte, iar pe de altă parte, macromoleculele vor fi „bombardate" de ionii aflați în mișcare, ceea ce poate provoca trecerea acestora în stare excitantă, facilitînd cataliza enzimatică.

CONCLUZII

Experimentul efectuat și rezultatele prezentate au pus în evidență efectul C.E.M. asupra reacțiiior enzimatice, efect constînd în creșterea vitezei de reacție a LDH.

Calculele efectuate au permis să se tragă concluzia că mărirea vitezei de reacție este un efect direct al acțiunii cîmpului și nu se datorează doar creșterii temperaturii, la rîndul ei consecință a degradării energiei cîmpului electromagnetic.

Prezentat la redacție
la 26 noiembrie 1984

* *Centrul de cercetări biologice „Stejarul".*
Piatra Neamț. str. Alexandru cel Bun nr. 6
** *Colectivul de cercetări interdisciplinare,*
Disciplina de biochimie, Fundeni
București, Șos. Fundeni nr. 258

INTERACTION OF THE HIGH FREQUENCY ELECTROMAGNETIC FIELD WITH LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY

Summary

The activity of LDH in a high frequency electromagnetic field has been followed. A field of 500 MHz has been applied directly to the spectrophotometric cuvette. The whole set-up was arranged in such a manner as to obtain a uniform field in all the reaction mixture volume.

An increase in the pyruvate → lactate reaction has been observed, when all the parameters of the experiment have been thoroughly analyzed.

BIBLIOGRAFIE

1. J. H. GOLD, Intern. J. Quant. Chem., *4*, 353—354 (1971).
2. FRÖHLICH H., Il Nouvo Cimento, **7**, *3* (1977).
3. P. D. BOYER, *The Enzymes: Kinetics and Mechanism*, vol. II, Academic Press, New York-London, 1970.
4. M. DIXON, C. E. WEBB, *Enzymes*, Third Ed., Longman Group Limited, London, 1979.
5. G. CARERI, Approach. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., **8**, 69—97 (1979).

REACȚIA DINTRE FRAGMENTELE Fab ȘI Fc IZOLATE DIN ANTICORPII ANTIALBUMINĂ ȘI ALBUMINA UMANĂ POLIMERIZATĂ CU GLUTARALDEHIDĂ

CRISTINA TĂNASE

Rezumat. S-a dovedit că anticorpii antialbumină prezenți în serul normal și al pacienților cu afecțiuni hepatice reacționează cu albumina umană polimerizată cu glutaraldehidă prin fragmentul Fab. Aceste rezultate dovedesc că reacția anticorpilor antialbumină cu antigenul corespondent este mediată prin situsurile lor de combinare.

Serul pacienților hepatici reacționează cu albumina serică umană polimerizată cu glutaraldehidă (ASUP) (1), după cum s-a demonstrat cu ajutorul tehnicilor imunologice standard : imunodifuzie (2), hemaglutinare, imunoadsorbție (3) și radioimunodozare (4). Atribuirea acestei reacții unor anticorpi antialbumină polimerizată (AAA) (5) a fost făcută pe baza precizării faptului că reactivitatea serurilor patologice se datorează imunoglobulinelor (IgG și IgM) (3), (6), (7).

Lucrarea de față și-a propus să studieze reactivitatea fragmentelor Fab și Fc izolate din AAA aparținînd clasei IgG. Pînă în prezent nu există în literatura de specialitate nici o lucrare care să dovedească direct că reacția dintre AAA și albumina serică umană polimerizată cu glutaraldehidă (ASUP), respectiv albumina serică de iepure polimerizată cu glutaraldehidă (ASIP), se realizează prin intermediul regiunii Fab, deci că AAA sînt anticorpi autentici. Această demonstrație directă este cu atît mai necesară cu cît există posibilitatea ca reacția dintre ASUP și serul pacienților să implice imunoglobulinele G și M, dar prin regiunea Fc.

Lucrarea a pornit de la ideea utilizării unor AAA cu o specificitate demonstrată. Aceștia sînt AAA la iepure imunizat cu ASIP. La aceste animale se elaborează un răspuns imun specific, materializat prin apariția unor anticorpi care pot reacționa specific cu grupări determinante (grupări piridinice), introduse în molecula albuminei prin tratare cu glutaraldehidă.

Experiențele efectuate cu sistemul ASIP-AAA anti-ASIP au fost extinse și asupra sistemului ASUP-AAA, dovedindu-se că și la om AAA reacționează cu albumina polimerizată prin intermediul fragmentului Fab, deci o reacție Ag-Ac autentică.

MATERIAL ȘI METODE

Proteine : Albumina serică umană (ASU), albumina serică de iepure (ASI) și ovalbumina (OA) au fost folosite ca atare sau polimerizate cu glutaraldehidă (GA). Formele polimerizate s-au notat ASUP, ASIP.

Pacienți. S-au testat 50 de seruri de hepatită virală acută (HVA), hepatită cronică (HC) și ciroză hepatică (CH), din care au fost selectate prin tehnica de radioimunodozare cele cu titrul cel mai mare de AAA ; din acestea s-au extras IgG și AAA aparținînd clasei IgG, apoi fragmentele Fab și Fc. A fost folosit și un grup de subiecți normali.

Animale de experiență. Au fost imunizate cu ASIP și s-au efectuat experiențe cu fragmentele Fab și Fc izolate din AAA extrași din serul a 10 iepuri.

Izolarea AAA din serul iepurilor imunizați cu ASIP și din serul uman normal și patologic. S-au efectuat : a) legarea cu cianogen-bromid a ASIP și ASUP de Sepharose 4B ; b) cromatografia de afinitate pe ASIP și ASUP—Sepharose 4B. S-au utilizat coloane de ASIP și, respectiv,

ASUP — Sepharose 4B cu dimensiuni de 3,5 cm × 1,6 cm. Serurile au fost trecute pe aceste coloane. Anticorpii fixați de coloană au fost desorbiți cu tampon glicocol 0,1 M, pH 1,8, apoi concentrați și dializați față de PBS.

La serurile umane, cromatografia de afinitate s-a practicat pornind de la IgG extras din serurile respective prin cromatografie pe SpA-Sepharose 4B (6,5 × 1,5 cm).

Hidroliza cu papaină și izolarea fragmentelor Fab și Fc. *Condiții de hidroliză.* Hidroliza s-a efectuat cu papaină 1%, concentrație proteică 0,56 mg/ml, cisteină 0,01 M, EDTA 0,002 M, 5 ore la 37°C. Reacția a fost blocată cu iodacetamidă 0,001 M, 10 minute la temperatura camerei. *Separarea fragmentelor* s-a efectuat prin cromatografie pe SpA-Sepharose 4B în PBS. Proteina nereținută a fost fragmentul Fab, iar proteina reținută și eluată cu tampon citrat 0,1 M, pH 4 a fost fragmentul Fc. Ambele au fost concentrate și dializate față de tampon veronal pH 8,6, μ = = 0,05.

Analiza fragmentelor Fab și Fc. *Imunoelectroforeza.* S-au analizat AAA din ser de iepure sau de om față de ser de oaie antiiepure, respectiv antiom total și anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG de iepure sau om. Rezultatele au arătat că preparatele nu conțin decît IgG de iepure sau om, deci sînt pure. Analiza pe poliacrilamidă 6% fără SDS arată că AAA din ser de iepure sau om sînt puri. Analiza fragmentelor Fab și Fc indică la Fab un aspect eterogen, iar la Fc un aspect omogen. Fragmentele Fab și Fc nu sînt impurificate reciproc și nici cu IgG nehidrolizat; de asemenea nu sînt impurificate cu albumină.

Hemaglutinarea (3). S-a practicat reacția de hemaglutinare cu E-ASIP și E-ASUP (0,5%) în VBS folosind ca diluant BSA — 1 mg/ml în VBS. S-au testat toate preparatele AAA, Fab și Fc de iepure sau om. Rezultatele arată că AAA de tip IgG de iepure și om aglutinează E-ASIP, respectiv E-ASUP comparabil cu serul inițial. Fragmentele Fab din AAA de iepure sau om nu aglutinează E-ASIP, respectiv E-ASUP. Fragmentele Fc din AAA de iepure sau om aglutinează E-ASIP, respectiv E-ASUP, dar într-o proporție de aproximativ 1500 de ori mai mică decît AAA.

Radiomarcarea liganzilor. Au fost radiomarcați următorii produși: ASIP, ASUP, AAA-IgG iepure, AAA-IgG om.

ASIP și ASUP au fost radiomarcați folosind tehnica radiomarcării cu lactoperoxidază (0,1 mCi/mg), obținîndu-se o radioactivitate specifică de $3,5 \times 10^8$ cpm/mg, respectiv 4×10^8 cpm/mg.

AAA IgG iepure și om au fost radiomarcați folosind aceea și tehnică (0,04 mCi/mg) obținîndu-se o activitate specifică de $1,2 \times 10^7$ cpm/mg, respectiv $1,4 \times 10^7$ cpm/mg.

Testul de legare a ASIP imobilizat pe suprafața godeurilor unor plăcuțe de plastic de AAA-IgG, Fab și Fc. Pe suprafața godeurilor unei plăcuțe de plastic s-a fixat prin adsorbție ASIP. S-au adăugat în diluții seriale ^{125}I—AAA-IgG, ^{125}I-Fab, ^{125}I-Fc, folosind ca diluant VBS în BSA 1%. Au urmat o incubare la 4°C de 24 ore, apoi cinci spălări cu VBS-Tween și citirea radioactivității legate.

Determinarea proporției de AAA în IgG izolate din seruri normale și patologice (4). S-a izolat IgG din seruri normale și patologice prin cromatografie pe SpA-Sepharose 4B (coloană 6,5 × 1,5 cm) în PBS. S-a eluat cu tampon citrat 0,1 M, pH 4, tamponat cu Tris-HCl 1 M, pH 8. Preparatele au fost dializate față de PBS și tampon veronal. S-au efectuat pentru fiecare IgG curbe de legare a ^{125}I-ASUP de AAA conținut în IgG respectiv; s-au incubat 2 ore la 4°C diluții seriale de IgG cu ^{125}I-ASUP. Apoi s-au adăugat *Staphilococcus aureus* (SA) pentru fixarea complexelor ^{125}I-ASUP-IgG. Au urmat spălări, centrifugări și măsurarea radioactivității legate.

S-a calculat pentru fiecare curbă ABC-33.

Testul de inhibiție prin Fab a legării AAA de tip IgG de ^{125}I-ASIP și ^{125}I-ASUP. S-au izolat AAA de tip IgG din ser de iepure, respectiv om, prin cromatografie de afinitate pe ASIP și, respectiv, ASUP-Sepharose 4B. S-au izolat fragmentele Fab și Fc.

Condiții de inhibiție: s-au incubat o oră la 37°C Fab în diluții seriale cu ^{125}I-ASIP, respectiv ^{125}I-ASUP; apoi au urmat adăugare de AAA-IgG ce leagă 50% din ^{125}I-ASIP sau ^{125}I-ASUP și incubare de o oră la 4°C. S-a măsurat radioactivitatea inițială. Apoi s-a adăugat suspensie de SA pentru fixarea complexelor ^{125}I-ASIP-IgG sau ^{125}I-ASUP-IgG. Au urmat trei spălări cu OA în tampon veronal pH 8,6, μ = 0,05, după care s-a măsurat radioactivitatea legată și s-a raportat la radioactivitatea inițială, obținîndu-se procentul de inhibiție.

REZULTATE

Localizarea situsurilor de combinare în fragmentul Fab la AAA din serul de iepure. S-au obținut fragmentele Fab și Fc pure din AAA aparținînd serurilor de iepure, utilizînd procedeul

prescurtat mai jos :

Ser de iepure imunizat cu ASIP
↓
Cromatografie de afinitate pe ASIP-Sepharose-4B
↓
AAA-IgG anti-ASIP
↓
Hidroliza cu papainã şi
↓
Cromatografie pe SpA-Sepharose 4B

↓ ↓

Fab din anticorpi anti-ASIP Fc din anticorpi anti-ASIP

Fragmentele Fab si Fc, de asemenea AAA-IgG iniţial au fost radiomarcate cu ^{125}I şi s-a testat printr-un procedeu radiometric capacitatea aeestor liganzi de a interacţiona cu ASIP imobilizat (fixat de godeurile unei plăcuţe de plastic). Tehnica este prezentată în schema următoare :

ASIP imobilizat
\+ { ^{125}I-AAA-IgG, ^{125}I-Fab, ^{125}I-Fc } în diluţii seriale
Incubare 24 ore la 4°C şi
Spălarea excesului nereacţionat
↓
Decuparea godeurilor de plastic şi
Citirea radioactivităţii fixate
↓
Curbă de fixare

Rezultatele obţinute sînt ilustrate în figura 1.

Se observă că numai fragmentul Fab conservă capacitatea de interacţiune a AAA de tip IgG iniţială (aproximativ 50% din capacitatea IgG iniţial). Fixarea fragmentului Fc este nesemnificativă.

Un alt procedeu de testare a utilizat **inhibiţia reacţiei ^{125}I-ASIP-AAA anti-ASIP de către fragmentele Fab şi Fc,** test prezentat în schema din figura 2.

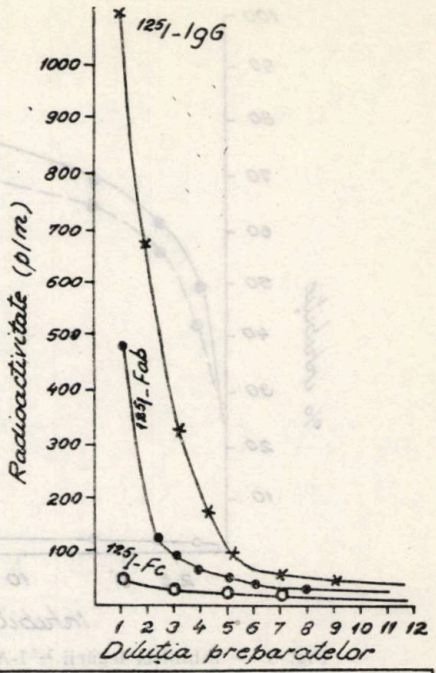
Rezultatul a mai multe experimente a arătat că fragmentul Fab determină o inhibiţie de aproximativ 80% a legăturii IgG de ^{125}I-ASIP, în timp ce fragmentul Fc este practic lipsit de activitate inhibitorie.

Rezultatele obţinute prin aplicarea testului de inhibiţie sînt înfăţişate în figura 3.

Determinarea proporţiei de AAA în IgG izolat din seruri umane normale şi patologice (HVA, HCA, CH). S-au izolat IgG din mai multe seruri umane normale şi patologice (HVA, HCA, CH) pe SpA-Sepharose 4B.

S-a analizat capacitatea acestor preparate de a lega ^{125}I-ASUP pornind de la aceeaşi concentraţie atît pentru IgG normal cît şi pentru cel patologic. Din curbele de legare efectuate (exemplificate în fig. 4) rezultă că în IgG izolat din seruri patologice proprorţia de AAA este de 40 de ori mai mare decît în IgG izolat din seruri normale, valori obţinute prin determinarea ABC-33 pentru fiecare curbă de legare (0,055 mg/ml seruri patoogice faţă de 2,2 mg/ml seruri normale).

Fig. 1. — Legarea ^{125}I-IgG, ^{125}I-Fab şi ^{125}I-Fc (anti-ASIP) de godeuri de plastic.



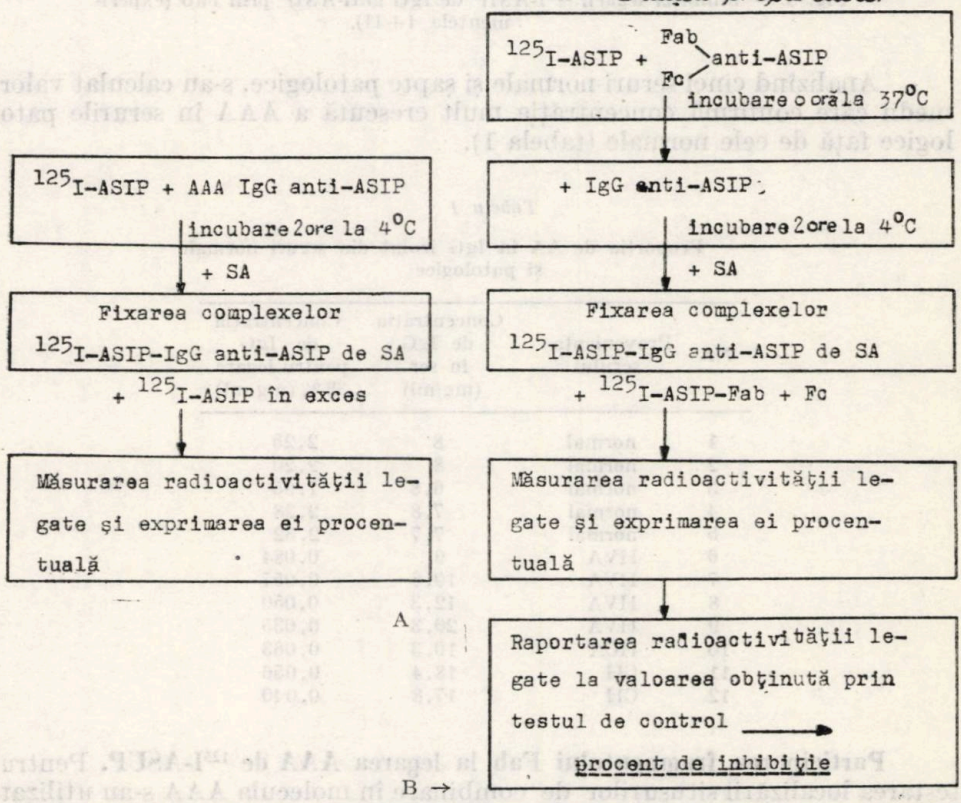

125I-ASIP + Fab anti-ASIP Fc
incubare o oră la 37°C
125I-ASIP + AAA IgG anti-ASIP
incubare 2 ore la 4°C
+ IgG anti-ASIP
incubare 2 ore la 4°C
+ SA
+ SA
Fixarea complexelor 125I-ASIP-IgG anti-ASIP de SA
Fixarea complexelor 125I-ASIP-IgG anti-ASIP de SA
+ 125I-ASIP în exces
+ 125I-ASIP-Fab + Fc
Măsurarea radioactivităţii legate şi exprimarea ei procentuală
Măsurarea radioactivităţii legate şi exprimarea ei procentuală
A
Raportarea radioactivităţii legate la valoarea obţinută prin testul de control
procent de inhibiţie
B

Fig. 2.—Testul de in inhibiţie a legării ^{125}I-ASIP de AAA de tip IgG prin Fab : *A*, test control ; *B*, test inhibiţie.

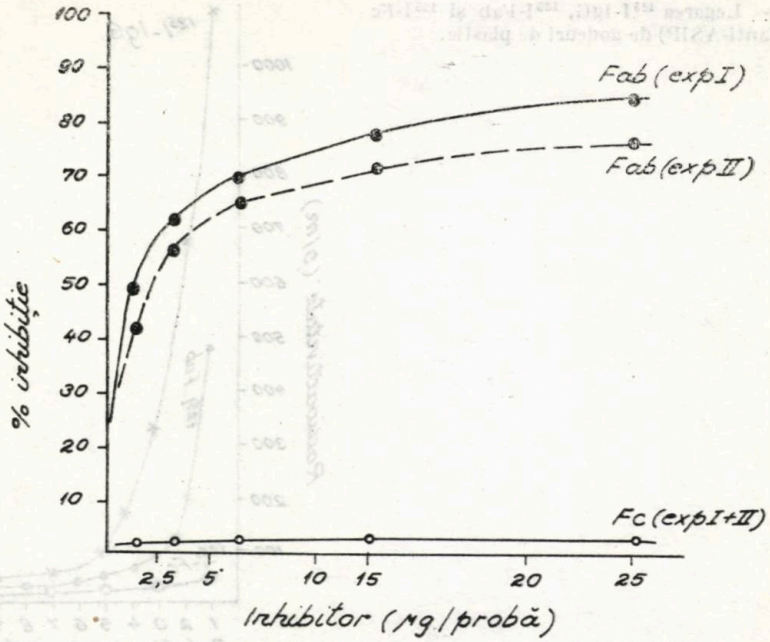


Fig. 3. — Inhibiția legării ^{125}I-ASIP de IgG anti-ASIP prin Fab (experimentele I+II).

Analizînd cinci seruri normale și șapte patologice, s-au calculat valori medii care confirmă concentrația mult crescută a AAA în serurile patologice față de cele normale (tabela 1).

Tabela 1

Proporția de AA în IgG izolat din seruri normale și patologice

Nr.	Proveniența serului	Concentrația de IgG în ser (mg/ml)	Concentrația de IgG pentru legare 33% (mg/ml)
1	normal	8	2,25
2	normal	8	2,20
3	normal	6,8	1,95
4	normal	7,8	2,28
5	normal	7,7	2,32
6	HVA	9	0,084
7	HVA	10,6	0,057
8	HVA	12,3	0,050
9	HVA	20,3	0,035
10	HCA	10,3	0,063
11	CH	18,4	0,056
12	CH	17,8	0,040

Participarea fragmentului Fab la legarea AAA de ^{125}I-ASUP. Pentru testarea localizării situsurilor de combinare în molecula AAA s-au utilizat fragmentele Fab și Fc izolate din AAA-IgG prin procedeul indicat pentru AAA izolați din serul de iepure. Fragmentele Fab și Fc pure au fost utilizate

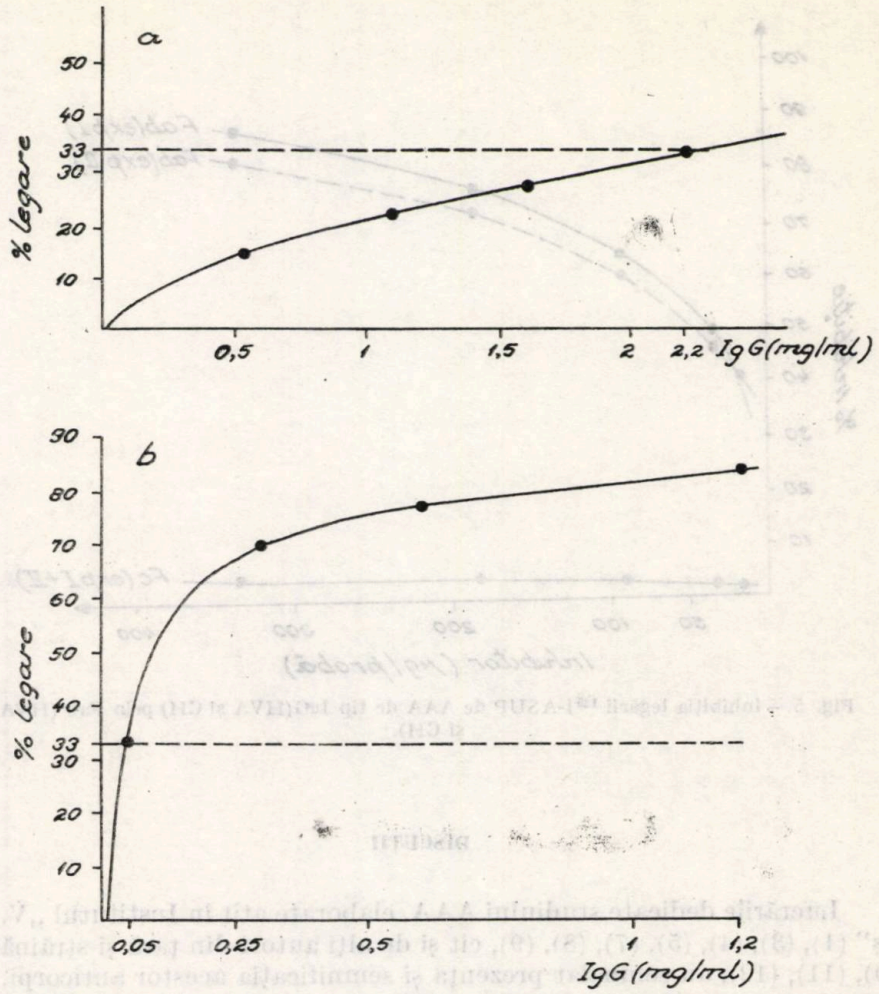


Fig. 4. — Curbe de legare a IgG anti-AAA izolat dintr-un ser normal (*a*) și un ser patologic (*b*) : *a*, concentrația de IgG ce realizează o legare de 33 % = 2,2 mg/ml ; *b*, concentrația de IgG ce realizează o legare de 33 % = 0,055 mg/ml.

în testul de inhibiție după modelul prezentat pentru fragmentele Fab și Fc din AAA de iepure (fig. 2).

Rezultatele obținute cu fragmentul Fab izolat din AAA din seruri patologice (HVA si CH) au arătat că acest fragment este capabil să producă o inhibiție a reacției dintre AAA-IgG și ^{125}I-ASUP pînă la valori semnificative (80—90 %). Calculele efectuate au arătat că, la o concentrație de Fab de 40 μg/probă, se obține o inhibiție a reacției de 50 %, ceea ce revine la un raport molar Fab/IgG ≈ 2. Cu alte cuvinte, pentru a inhiba cu 50 % legarea IgG anti-ASUP de ^{125}I-ASUP sînt necesare două molecule Fab pentru o moleculă de IgG (fig. 5).

Fragmentul Fc nu a inhibat semnificativ reacția de mai sus.

Experiențele de legare directă a fragmentelor Fab și Fc radiomarcate de ASUP imobilizat nu au furnizat rezultate concludente din cauza tendinței fragmentului Fc de a se lega nespecific (prin adsorbție).

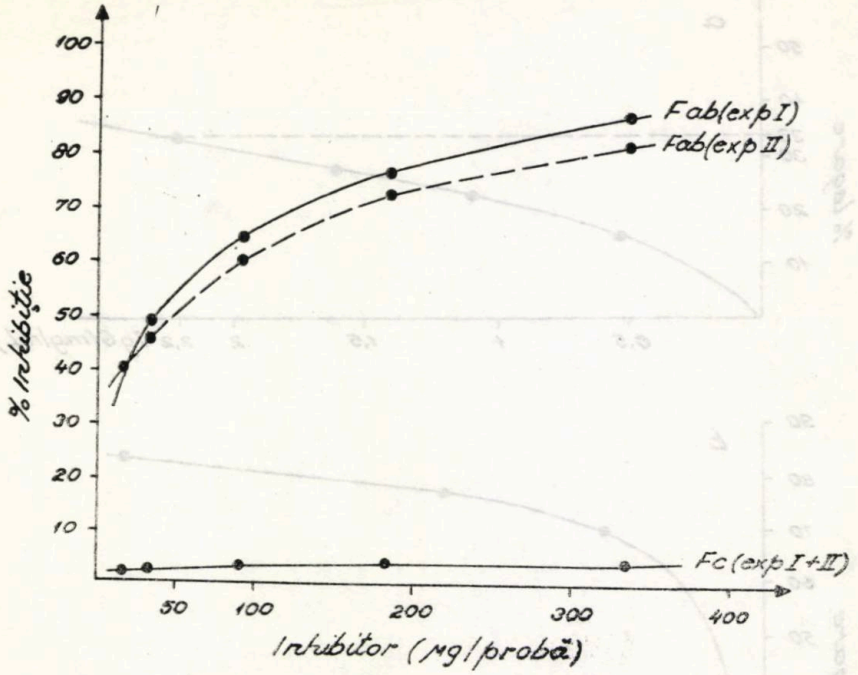


Fig. 5.— Inhibiția legării ^{125}I-ASUP de AAA de tip IgG(HVA și CH) prin Fab (HVA și CH).

DISCUȚII

Lucrările dedicate studiului AAA, elaborate atît în Institutul „V. Babeș" (1), (3), (4), (5), (7), (8), (9), cît și de alți autori din țară și străinătate (10), (11), (12), au semnalat prezența și semnificația acestor anticorpi, dar pînă în prezent nu au existat dovezi directe că relația AAA-ASUP se realizează prin intermediul unor situsuri de combinare specifice.

Nevoia de a aduce o dovadă experimentală directă asupra autenticiății AAA s-a impus cu atît mai mult cu cît nu era exclusă posibilitatea tnteracțiunii AAA-ASUP prin regiunea efectoare a IgG, fragmentul Fc.

Rezultatele obținute în această lucrare au dovedit că procedeele utizate pentru demonstrarea localizării situsurilor de reacție AAA-ASUP în regiunea Fab a IgG sînt corecte. Astfel, testarea sistemului AAA-ASIP, în care participarea prin Fab este certă, a condus la concluzia că testul de inhibiție a legării prin fragmente este adecvat și măsoară o reacție autentică Ag-Ac. Aplicînd acest procedeu la sistemul AAA-ASUP, s-au obținut rezultate similare, ceea ce dovedește că și în acest sistem reacția dintre cei doi componenți este o reacție de tip Ag-Ac.

De altfel, evaluînd proporția de AAA în IgG izolat din seruri normale și patologice, s-au obținut rezultate concludente, care au demonstrat creșterea notabilă a procentului de AAA în IgG în urma unor disfuncții hepatice.

CONCLUZII

Lucrarea prezentă aduce o dovadă directă că reacţia dintre AAA (la iepure sau om) cu antigenul corespondent (albumină polimerizată de iepure sau om) este o reacţie Ag-Ac autentică, avînd caracteristicile de specificitate cerute de o atare reacţie.

Precizăm că, în ciuda numeroaselor lucrări publicate în această direcţie, o dovadă directă a specificităţii reacţiei nu a fost adusă de nici una din lucrările precedente.

Prezentat la redacţie
la 8 octombrie 1984

Institutul „V. Babeş", Bucureşti
Laboratorul de imunologie

THE REACTION OF Fab AND Fc FRAGMENTS ISOLATED FROM ANTIALBUMIN ANTIBODIES AND HUMAN ALBUMIN POLYMERISED WITH GLUTARALDEHYDE

Summary

It has been shown that anti-albumin antibodies present both in normal sera and in those of hepatic patients react with human albumin polymerised with glutaraldehyde by their Fab fragment. These results prove that the reaction of anti-albumin antibodies with the corresponding antigen is mediated through their combining sites.

BIBLIOGRAFIE

1. D. ONICĂ, I. MĂRGINEANU, R. LENKEI, Molec. Immun., **18**, 807 (1981).
2. G. KRONVALL, P. G. QUIE, R. C. WILLIAMS, J. Immunol., **104**, 273 (1970).
3. R. LENKEI, V. GHEŢIE, J. Immunol. Methods, **16**, 23 (1977).
4. S. MIHĂESCU, R. LENKEI, V. GHEŢIE, J. Immunol. Methods, **42**, 187 (1981).
5. R. LENKEI, G. MOŢA, M. E. DAN, M. LAKY, Rev. Roum. Biochem., **11**, 271 (1974).
6. S. N. THUNG, M. A. GERBER, Gastroenterology, **80**, 260 (1981).
7. D. ONICĂ, A. CĂLUGĂRU, I. MĂRGINEANU, G. ZAMFIR, I. BELAŞCU, Clin. Immun. Immunopath., **26**, 223 (1983).
8. R. LENKEI, Rev. Roum. Med. Interne, **18**, 129 (1980).
9. R. LENKEI, L. BULIGESCU, I. BELAŞCU, D. POSPAI, I. DOBRE, Clin. Exp. Immunol., **43**, 381 (1981).
10. D. R. MILICH, P. K. BHATNAGAR, E. D. PAPAS, N. G. VYAS, J. Med. Virol., **7**, 193 (1981).
11. D R. MILICH, E. D. PAPAS, P. K. BHATNAGER, G. N. VYAS, J. Med. Virol., **7**, 181 (1981).
12. S. N. THUNG, M. GERBER, Infect. Immun., **32**, 1292 (1981).

PROTEOGLICANII ŞI GLICOZAMINOGLICANII MEMBRANARI ŞI ROLUL LOR ÎN INTERACŢIUNILE CELULARE*

DOINA POPOV

I. Proteoglicanii şi glicozaminoglicanii matriceali
1. Compoziţia chimică
2. Variabilitatea organizării structurale
3. Proteoglicanii şi glicozaminoglicanii din ţesuturi vasculare
II. Proteoglicanii şi glicozaminoglicanii membranari
1. Localizarea proteoglicanilor şi glicozaminoglicanilor la nivelul membranei celulare
1.1. Tehnici de microscopie electronică
1.2. Tehnici imunochimice
1.3. Utilizarea lectinelor
1.4. Utilizarea trasorilor radioactivi
1.5. Procedee chimice
2. Distribuţia şi modul de legare a proteoglicanilor în raport cu membrana celulară
3. Specii moleculare de proteoglicani asociaţi tipic membranei celulare
III. Proteoglicanii şi glicozaminoglicanii celulelor endoteliale
IV. Participarea proteoglicanilor şi glicozaminoglicanilor în procese celulare fundamentale
1. Interacţiunile celulă—celulă
2. Interacţiunile celulă —substrat
3. Proliferarea celulară
4. Ciclul celular
5. Morfogeneză
V. Concluzii

I. PROTEOGLICANII ŞI GLICOZAMINOGLICANII MATRICEALI

1. COMPOZIŢIA CHIMICĂ

Proteoglicanii (PG) sînt macromolecule complexe, formate din lanţuri polizaharidice de glicozaminoglicani (GAG), legate covalent la o proteină axială („core") (1). Excepţie face acidul hialuronic (HA), la care nu s-a pus în evidenţă existenţa unei proteine axiale.

Lanţurile polizaharidice ale condroitinsulfatului (ChS), dermatansulfatului (DS), heparinei (H) şi heparansulfatului (HS) sînt legate glicozidic prin resturi gal-gal-xil la OH-ul unui rest de serină din proteină. În cazul keratansulfatului (KS) scheletic, legarea este tot de tip glicozidic la OH-ul unei serine sau treonine, pe cînd în cazul KS din cornee, legarea este de tip N-glicozilaminic la NH_2-ul unui rest de asparagină.

Glicozaminoglicanii cuprind lanţuri polizaharidice liniare, de lungimi variabile, alcătuite din unităţi dizaharidice repetitive, formate dintr-un

---

* Lucrarea a fost prezentată, în formă rezumativă, la Simpozionul „Organizarea şi funcţiile membranelor celulare" din cadrul celei de-a doua Sesiuni anuale a Societăţii Naţionale de Biologie Celulară, 29—30 iunie 1984, Institutul de biologie şi patologie celulară.

Unele aspecte sînt exemplificate prin date personale asupra GAG matriceali de origine vasculară, precum şi din celule endoteliale izolate.

rest de acid hexuronic și un rest de hexozamină. Restul de acid hexuronic este acid D-glucuronic în HA și ChS, acid D-glucuronic și acid L-iduronic în H și HS, sau acid L-iduronic în DS. KS cuprinde galactoză în loc de acid hexuronic.

Restul de hexozamină diferă între tipurile de GAG : glucozamină N-acetilată în HA, H și HS, glucozamină în KS și galactozamină N-acetilată în ChS și DS.

2. VARIABILITATEA ORGANIZĂRII STRUCTURALE

La varietatea de compoziție a unităților dizaharidice repetitive ale GAG se adaugă și alte diferențe în ceea ce privește :

— poziția și configurația legăturilor glicozidice dintre acidul hexuronic și hexozamină : configurație β în HA, ChS, DS, KS și configurație α la H și HS ;

— poziția și numărul grupărilor sulfat, care sînt diferite : singurul GAG nesulfatat este HA ; grupări O-sulfat la C_4 în Ch4S și în DS sau la C_6 în Ch6S, H, HS și KS ; grupări N-sulfat în H și HS ;

— gradul de sulfatare, de asemenea diferit : Ch4S și Ch6S avînd 0,97—0,98 grupări sulfat/dizaharid față de DS : 1,29 și H : 2,33 grupări sulfat/dizaharid.

Numărul de unități dizaharidice repetitive este variabil : 2 500 în cazul HA, 60 în cazul ChS și DS, 10—15 la H și HS și 10—20 la KS, ceea ce determină greutăți moleculare diferite, cuprinse între 4 000 (HA și KS) și 8×10^6 (HA).

Heterogenitatea structurală a PG este sporită prin existența mai multor specii moleculare de GAG în cadrul aceleiași molecule de PG. PG cartilajelor cuprind per „core" proteic : 80 lanțuri de ChS de GM 20 000 fiecare și aproximativ 100 lanțuri de KS ; proteina axială este legată necovalent la o moleculă de acid hialuronic, prin intermediul unor proteine „de legătură" (2).

O structură diferită prezintă PG din lichidul foliculilor ovarieni (3). Din această sursă s-au identificat un PG de greutate moleculară mare, cu o proteină axială de GM ~ 300 000, 20 de lanțuri de DS de GM 55 000 și peste 300 de oligozaharide legate O-glicozidic prin resturi de N-acetilgalactozamină. Acesta nu are acid hialuronic component. În plus, s-a identificat un PG de greutate moleculară mică, de ordinul 10^3, format în special din DS și oligozaharide legate N-glicozilaminic la un rest de asparagină.

Proteoglicanii de heparansulfat din membrana plasmatică a hepatocitelor (3) cu GM ~ 80 000 și sînt constituiți din patru lanțuri de HS de GM ~ 14 000.

3. PROTEOGLICANII ȘI GLICOZAMINOGLICANII DIN ȚESUTURI VASCULARE

PG țesutului vascular au fost cercetați mai ales în aortă sub raportul modificării GAG în funcție de vîrstă, de severitatea aterosclerozei, precum și în legătură cu hipertensiunea arterială.

Există concordanțe în ceea ce privește tipurile de GAG din aortă. În general, straturile exterioare ale peretelui aortic (adventicea și media) cuprind HA, DS, HS ; intima conține preponderent ChS (4). Cantitățile de GAG aortici raportate de diferiți cercetători sînt însă diverse datorită aplicării unor metode diferite de izolare și determinare cantitativă a GAG ;

utilizării unor aorte întregi sau numai a unor preparate de intimă care conţin cantităţi variabile din tunica media ; variaţiei între specii : animalele susceptibile la ateroscleroză conţin cantităţi mai mari de Ch6S în media + intima, comparativ cu cele rezistente, care cuprind mai mult DS şi HS (5).

Din punct de vedere structural, PG vasculari au o structură similară celor din cartilaje : s-a dovedit asocierea HA cu lanţurile de PG, precum şi prezenţa proteinelor de legătură (6).

Spre deosebire de GAG din cartilaje, cei ai peretelui arterial au timpi de înjumătăţire mai scurţi, ceea ce indică un metabolism activ al GAG arteriali.

Levy şi Picard (7) au evidenţiat prezenţa hexozaminiltransferazei şi glucuroniltransferazei în fracţiunile obţinute dintr-un prepart de intima + media, enzime care intervin în biosinteza PG. Dintre speciile moleculare de GAG, cea mai mare încorporare a precursorilor marcaţi — sub acţiunea acestor enzime — se constată în HS şi HA.

Sinteza GAG este influenţată şi de considerente structurale, anatomice. Astfel, stressul peretelui arterial din coronara stîngă, în comparaţie cu cea dreaptă, şi din porţiunile proximale ale coronarei stîngi, faţă de cele distale, determină o sinteză crescută de GAG în aceste regiuni (8).

S-a studiat compoziţia în GAG şi a altor vase sanguine : coronare, iliace, cerebrale, venă cavă inferioară, artere pulmonare.

Cercetările noastre au urmărit identificarea şi determinarea cantitativă a GAG din artere, vene şi valvule cardiace de iepure, precum şi din celulele endoteliale izolate din aceste paturi vasculare (9).

Deoarece arterele şi venele diferă din punct de vedere structural şi funcţional, ni s-a părut interesant să identificăm tipurile de GAG constituenţi şi să determinăm proporţia fiecărei specii moleculare. O astfel de abordare poate contribui la decelarea acelor fenomene care fac ca venele să fie mai puţin susceptibile la procese sclerotice şi ateromatoase comparativ cu arterele.

Studiile noastre s-au desfăşurat asupra unor preparate de intima + media izolate din artere (toracică şi abdominală) şi vene (cavă şi jejunală) de iepuri New Zealand şi Chinchilla.

Identificarea speciilor moleculare de GAG s-a făcut electroforetic — pe acetat de celuloză — prin comigrare faţă de GAG standard. Separarea electroforetică a GAG în piridină—acid formic relevă prezenţa HA în preparatele de aortă toracică şi abdominală şi a unei benzi late corespunzătoare ca migrare cu HS, DS şi ChS (fig. 1, *a*). Electroforeza în acetat de bariu relevă prezenţa HS, DS, HA şi ChS în preparatele analizate (fig. 1, *b*). Limita de sensibilitate a metodei de colaborare a GAG cu albastru alcian, utilizată de noi, a fost de 0,5 μg GAG (10).

Densitometrarea electroforegramelor arată că HA şi HS reprezintă aproximativ 1/3 din GAG în arterele de iepure analizate şi în vena jejunală, fiind sub limita metodei noastre de detecţie în CA (fig. 2).

Rolul fiziologic al PG din matricea vaselor sanguine nu este complet elucidat. S-a sugerat că GAG formează un suport structural pentru peretele vascular, contribuie la menţinerea balanţei de fluide şi de electroliţi, afectează coagularea sanguină şi agregarea plachetară, iar în cazul arterelor reglează metabolismul lipidelor şi transportul lipoproteinelor prin endoteliu (11).

În ceea ce privește studiul GAG din inimă, o atenție specială a fost acordată cercetării compoziției în GAG a valvulelor cardiace. PG valvulari cuprind în special HA, Ch6S și DS, sînt mai mici decît PG cartilajelor și par a avea implicații în morfogeneza inimii (12), (13).

II. PROTEOGLICANII ȘI GLICOZAMINOGLICANII MEMBRANARI

Cu privire la organizarea moleculară și la rolul PG și GAG din membranele celulare, vom dezvolta în continuare modul în care s-a demonstrat prezența PG și GAG la nivelul membranelor celulare, distribuția acestora în raport cu membrana celulară și speciile moleculare de PG asociați tipic membranei celulare.

1. LOCALIZAREA PROTEOGLICANILOR ȘI GLICOZAMINOGLICANILOR LA NIVELUL MEMBRANEI CELULARE

1.1. Tehnici de microscopie electronică

Lanțurile polianionice ale GAG participă, alături de glicoproteinele și glicolipidele suprafeței, la sarcina electrică negativă a feței externe a membranei celulare, contribuind la asimetria chimică și funcțională a acesteia în raport cu fața citoplasmatică. Ca urmare, grupările anionice ale GAG fixează cu afinitate ridicată feritina cationică (14), oxidul de fier coloidal (15) și acidul fosfotungstic (16). Evidențierea este deci nespecifică, existînd interferența și a altor molecule electronegative expuse la fața externă a membranei.

Coloranții cationici au fost utilizați cu succes în demonstrarea prezenței PG și GAG membranari, în special albastrul alcian (17), acridin-orange (18) și roșul de ruteniu (RR). Cationul de $[Ru_3O_2(NH_3)_{14}]^{6+}$ se leagă electrostatic la grupările carboxil, sulfat și sulfamino ale părții de GAG din PG, grupări complet ionizate la pH fiziologic. Reacția necesită prezența OsO_4, pentru a forma un complex cu densitate de electroni suficientă, electronoopac (19). Deoarece caracterul polianionic este o proprietate comună tuturor GAG, complexarea cu coloranții cationici este nespecifică în ceea ce privește tipul de GAG evidențiat.

Specificitatea ambelor tipuri de metode, menționate mai înainte, poate fi realizată prin acțiunea prealabilă a unor enzime cu specificitate strictă asupra unei specii moleculare de GAG, urmată de evidențierea prezenței GAG rămași nedegradați la suprafața celulară.

În cazul evidențierii GAG la suprafața celulelor endoteliale din cornee, specificitatea colorației a fost asigurată prin digestia glicocalixului cu hialuronidază testiculară, care hidrolizează HA, Ch4S și Ch6S. Ca urmare, colorația apărută este datorată complexelor formate de roșul de ruteniu și HS, H, DS și KS (20).

Prin digestii enzimatice, urmate de colorarea secțiunilor cu RR, s-a stabilit prezența HA și ChS la nivelul endoteliului rețelei trabeculare și a plexului apos al sistemului de eliminare fluidă al ochiului (21). În glaucom, crește cantitatea de GAG, prezența acestor molecule fiind detectată și în lamina bazală a celulelor endoteliale, în substanța fundamentală care înconjură fibrele elastice și în țesutul conjunctiv al plexului apos.

Experimente realizate „in situ" au dovedit că diafragmele fenestrelor celulelor endoteliale din microvasculatură sînt alcătuite în special

din heparansulfat, care contribuie în majoritate la sarcina negativă a acestor componente structurale ale endoteliului (22), (23), (24).

M. Simionescu și N. Simionescu au inițiat și utilizarea acidului tanic (2%) în componența fixativului (p-formaldehidă 2%, glutaraldehidă 1,5%) pentru evidențierea electronomicroscopică a acidului hialuronic. Grupările -OH și -COOH ionizabile ale moleculelor de HA interacționează cu acidul tanic, care funcționează ca mordant pentru creșterea legării metalelor grele și, deci, a electronoopacității HA în preparatele observate (25), (26).

1.2. Tehnici imunochimice

Prepararea de anticorpi față de PG membranari a fost realizată numai de Höök și colab. (27), care au reușit obținerea unui anticorp anti--PG-HS din plasmalema hepatocitelor.

Izolînd un PG de ChS dintr-o tumoră de sac vitelin, Oldberg și colab. (28) au demonstrat prin imunofluorescență localizarea sa la suprafața celulară, reprezentînd prima dovadă a ridicării unui anticorp față de un PG neconjunctiv.

Recent, Buonassisi și Colburn (29) au preparat un antiser de capră anti-PG secretați în mediul de cultură al celulelor endoteliale, demonstrînd biochimic specificitatea sa față de PG de HS ai celulelor endoteliale.

1.3. Utilizarea lectinelor

Interacțiunea dintre GAG sulfatați și lectine are loc la pH scăzut și la tărie ionică joasă și se bazează pe interacțiuni electrostatice nespecifice. H, HS, ChS formează precipitate cu Con A, la pH<7. Caracterul electrostatic al legării este confirmat de inhibarea reacției la concentrații saline ridicate (30).

Interacțiunea dintre KS cu grupări libere N-acetil-D-glucozaminil și WGA este specifică legării prin zahăr, deci de tip lectinic. Grupările sulfat din KS pot exercita efecte sterice asupra reacției, desulfatarea KS crescînd afinitatea KS față de WGA (29).

Nakada și colab. (31) au arătat, în 1977, că digestia cu condroitinază a Ch4S de la suprafața hepatoamelor ascitice AH-133 îndepărtează GAG și expune centrii disponibili pentru legarea aglutininei din *Ricinus communis*.

1.4. Utilizarea trasorilor radioactivi

Utilizarea trasorilor radioactivi ca precursori ai GAG sau sub forma GAG marcați a constituit un alt sistem de lucru prin care s-a dovedit localizarea acestor molecule la suprafața membranei celulare.

Injectarea unor precursori marcați ai GAG, de tipul $^{35}SO_4^{2-}$, a permis localizarea prin radioautografie a GAG sulfatați pe membrana celulelor epiteliale din mucoasa gastrică. Trasorul apare în PG marcați, la nivelul suprafeței foveolelor și istmurilor (32).

Injectarea de $^{35}SO_4^{2-}$, urmată de perfuzia rețelei vasculare pulmonare cu proteaze de spectru larg (tripsină), a permis identificarea unor glicopeptide sulfatate în eluatul colectat (33). Întrucît integritatea structurală a țesutului pulmonar nu este modificată, este posibil ca glicopeptidele detectate să fie desprinse din glicocalixul celulelor endoteliale.

Un alt sistem de investigare a localizării la suprafață a GAG l-a constituit adaosul de GAG marcați la culturi celulare. Astfel, celulele 3T3

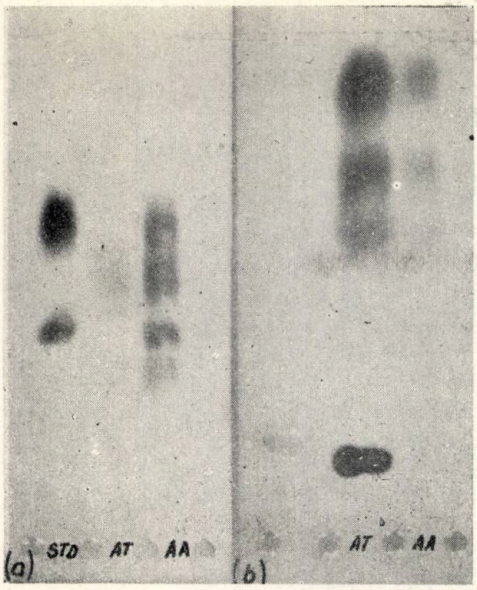


Fig. 1. — Separarea electroforetică a glicozaminoglicanilor din aorta toracică (AT) și aorta abdominală (AA) în piridină 0,1 M-acid formic 0,47 M, pH 3 (*a*) și în acetat de bariu 0,1 M, pH 7,4 (*b*).

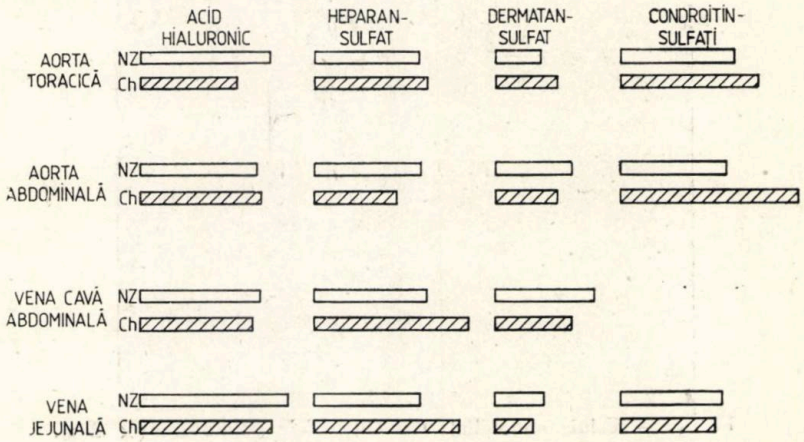


Fig. 2. — Conținutul în GAG (%) al arterelor și venelor iepurilor New Zealand (NZ) și Chinchilla (Ch). Procentul fiecărui GAG s-a estimat prin densitometrarea electroforegramelor și/sau prin determinarea colorimetrică a complexelor GAG — albastru alcian (9).

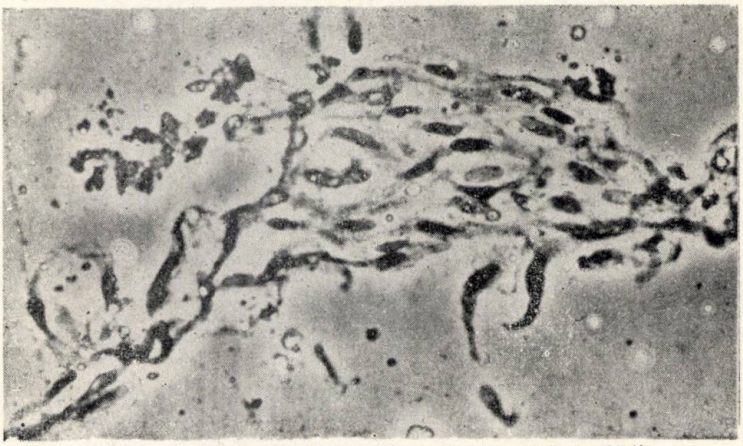


Fig. 3. — Celule endoteliale din aorta toracică (× 254).

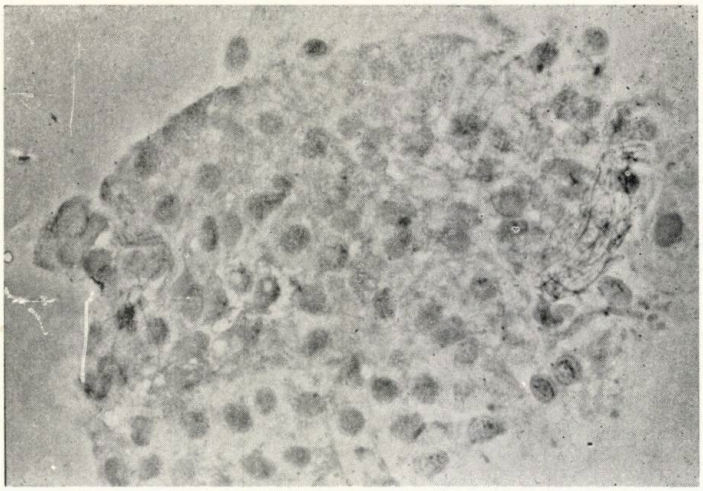


Fig. 4. — Celule endoteliale din valvulele bicuspide (× 254).

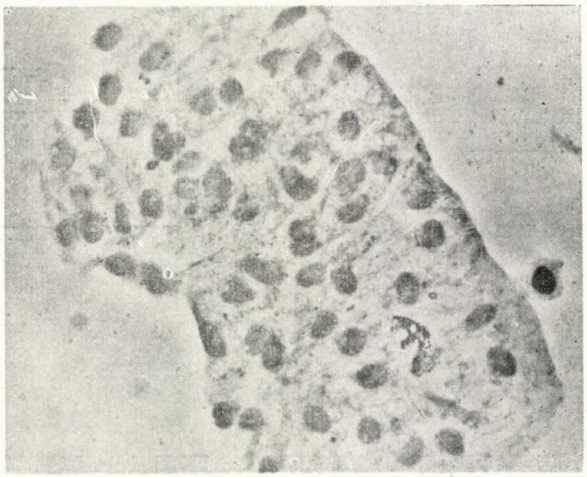


Fig. 5. — Celule endoteliale din sigmoidele pulmonare (× 254).

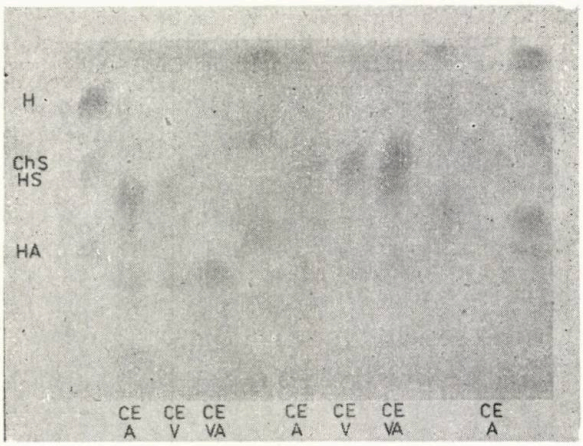


Fig. 6. — Separarea electroforetică a glicozaminoglicanilor din celule endoteliale în piridină 0,1 M — acid formic 0,47 M, pH 3.

și celulele transformate de virusul simian 40 (SV-3T3) leagă specific la suprafața celulară ^{3}H-HA (34).

Oligozaharidele ce cuprind minimum șase zaharuri constitutive inhibă legarea ^{3}H—HA, sugerînd că aceasta este dimensiunea minimă recunoscută de receptori ai suprafeței. Analizele Scatchard ale datelor de legare produse în aceste experimente au arătat că 46 ng de HA se leagă de 10^6 celule transformate și numai 7,6 ng de 10^6 celule 3T3 normale. Constanta de disociere este, ca urmare, mai scăzută la celulele transformate, la care legarea este mai puternică față de celulele normale, la care capacitatea de legare a ^{3}H—HA este mai redusă. Deci, transformarea virală afectează atît afinitatea, cît și gradul de legare al ^{3}H—HA la suprafața celulară.

Specificitatea legării ^{3}H—HA a fost demonstrată de autor prin faptul că marcarea suprafeței nu mai are loc dacă se adaugă și HA nemarcat. Legarea de suprafață a fost probată prin îndepărtarea completă a ^{3}H—HA la incubarea celulelor cu hialuronidază din *Streptomyces*. Deci, centrii de legare sînt localizați la suprafața celulară. Cum grosimea învelișului de HA măsoară 10—25 μ, este posibil ca o parte din HA să fie legată direct la suprafață, iar altă parte să fie reținută prin interacțiuni secundare cu alți componenți ai suprafeței, ca, de exemplu, cu fibronectina (FN).

1.5. Procedee chimice

Existența proteoglicanilor la nivelul suprafeței celulare a fost demonstrată la numeroase tipuri de celule prin :

— izolarea membranei plasmatice, urmată de detectarea PG, metodă utilizată în special pentru izolarea PG-HS din hepatocite (35) ;

— tratamentul proteolitic blînd al suspensiilor celulare sau al culturilor în monostrat, urmat de identificarea GAG desprinși de la suprafață (36).

O altă posibilitate de analiză chimică a GAG asociați suprafeței celulare este tratarea celulelor cu enzime specifice pentru degradarea unei specii moleculare de GAG. Ohkubo și colab. (37) au utilizat această posibilitate în îndepărtarea cu heparitinază a HS, GAG major la suprafața hepatoamelor ascitice AH—66.

Heparitinaza este superioară tripsinei, ca agent de înlăturare a HS suprafeței, deoarece, fiind specifică pentru HS, îndepărtează tot HS de la suprafața celulară, pe cînd tripsina eliberează numai jumătate din HS suprafeței. De asemenea, heparitinaza degradează numai HS, fără să afecteze alți componenți ai suprafeței celulare, cum ar fi glicoproteinele (GP), pe cînd tripsina eliberează și unele GP. În sfîrșit, pentru identificarea chimică a prezenței PG de HS în preparatele obținute din membrane celulare, se utilizează și degradarea dezaminantă a GAG N-sulfatați din moleculă.

În concluzie, tehnicile de microscopie electronică, de imunochimie, de utilizare a lectinelor și a trasorilor radioactivi, precum și procedeele enzimatice și chimice utilizate au demonstrat localizarea PG și GAG la nivelul membranei celulare.

2. DISTRIBUȚIA ȘI MODUL DE LEGARE A PROTEOGLICANILOR ÎN RAPORT CU MEMBRANA CELULARĂ

Studii detaliate au fost efectuate de Höök și colab. (27) asupra PG de HS din plasmalema hepatocitelor.

Interacțiunea PG de HS cu suprafața hepatocitelor este realizată prin două mecanisme diferite : a) legare prin lanțurile polizaharidice la un receptor al suprafeței și b) integrare a proteinei axiale — hidrofobe — a PG în stratul dublu al membranei.

Interacțiunea lanțurilor polizaharidice ale PG-HS cu receptori ai suprafeței hepatocitului este reversibilă; cel de-al doilea mecanism de ancorare, prin integrarea PG-HS în stratul dublu al membranei, este ireversibil, moleculele de PG fiind desprinse din membrane sub acțiunea detergenților, care rup interacțiunile hidrofobe. Prezența PG de HS s-a dovedit și la suprafața celulelor de hepatom ascitic. Privind comparativ proprietățile PG de HS din hepatocite și din hepatoame, se constată că acestea diferă : a) în ceea ce privește dimensiunea moleculelor : PG de HS din hepatocite au GM ~80 000, cu lanțuri de HS de GM ~14 000, iar cei din hepatoame au GM ~150 000, cu lanțuri de HS de GM ~40 000; b) în privința conținutului de sulfat, excepțional de mare în hepatocite față de conținutul scăzut în sulfat al PG—HS din hepatoame; c) în proporția de proteină din moleculă (50% proteină în PG—HS din hepatocite și 20% proteină în PG—HS din hepatoame); d) în afinitatea față de fibronectină. În hepatocite PG—HS sînt localizați, împreună cu FN, în structuri de tip fibrilar, pe cînd cei din hepatoame au o afinitate scăzută față de FN.

S-ar putea face observația asupra distincției dintre PG de HS și cei de H. Delaney și Conrad (38) au arătat că PG de H sînt localizați intracelular și sînt sintetizați de hepatocite și de preparate microzomale; sînt puternic sulfatați și bogați în acid L-iduronic.

PG de HS din hepatocite sînt localizați la suprafața membranei celulare, sînt sintetizați numai de hepatocite intacte (sinteza nu are loc în cazul preparatelor microzomale), par a fi mai puțin sulfatați față de PG de H și sînt mai bogați în acid D-glucuronic. Deși 20% din moleculă este identică cu PG de H, PG de HS prezintă numai 10% din activitatea anticoagulantă a H.

3. SPECII MOLECULARE DE PROTEOGLICANI ASOCIAȚI TIPIC MEMBRANEI CELULARE

Din cele prezentate rezultă că PG de HS sînt asociați specific membranelor celulare. Ei se găsesc nu numai la suprafața hepatocitelor, dar și la suprafața celulelor liniei CHO (39), a epiteliului mamar de șoarece (40), a celulelor endoteliale și a altor tipuri de celule.

PG de HS se găsesc nu numai la polul apical al celulei, dar și în structuri de tipul membranelor bazale care vin în strîns contact cu celulele.

La suprafața membranelor celulare a fost detectată și prezența PG de ChS în cazul condrocitelor în cultură (41) și al unor celule tumorale (28).

Cercetările lui Toole (34) au relevat prezența HA la suprafața celulară. Cu privire la rolul fiziologic al legării HA la suprafața celulară se menționează trei ipoteze : a) HA prins la anumiți „centri" ai suprafeței celulare ar fi preluat de celule prin endocitoză și degradat la nivelul lizozomilor, ipoteză concordantă cu activitatea hialuronidazică crescută a celulelor transformate SV3T3, comparativ cu a celulelor 3T3 normale. b) O a doua posibilitate este ca HA legat de suprafața celulară să modifice metabolismul celulei, inhibînd sinteza altor compuși (se cunoaște că HA inhibă parțial sinteza de ChS „in vitro"). c) În sfîrșit, învelișul de HA poate bloca accesul la suprafața celulară a altor macromolecule sau celule.

Speciile moleculare de PG și GAG asociați tipic membranei celulare sînt deci HS, ChS și HA.

III. PROTEOGLICANII ȘI GLICOZAMINOGLICANII CELULELOR ENDOTELIALE

O atenție specială a fost acordată PG și GAG celulelor endoteliale care mărginesc lumenul vascular. Hiebert și Jaques (42) au arătat că heparina exogenă injectată este preluată de endoteliu la 5 min de la administrare. Autorii au calculat că pe membrana celulară și în veziculele de la suprafața luminală concentrația de heparină atinge o activitate de 75—100 de ori mai mare decît cea din sînge (43). Capacitatea de legare a heparinei exogene de celula endotelială corespunde la 10^6 molecule de heparină/celulă.

Fixată la nivelul endoteliului, heparina ar ancora antitrombina și astfel ar crește acțiunea anticoagulantă la locul respectiv. În plus, heparina exogenă concentrată pe suprafața endoteliului ar acționa ca o barieră de permeabilitate a endoteliului intact față de factorii aterogeni din ser. Astfel, la nivelul endoteliului, heparina leagă și inactivează mulți din agenții care lezează endoteliul: histamina, serotonina, lizozimul, angiotensina, bradikinina, unii componenți ai complementului, unele virusuri și toxine (44).

În cele ce urmează ne vom referi la izolarea celulelor endoteliale (CE) și detectarea GAG asociați acestora, la urmărirea biosintezei GAG și PG în culturi celulare, la proprietățile PG și GAG endoteliali și la rolul acestor molecule în endoteliul vascular.

Există numeroase procedee de izolare a CE vasculare: răzuirea mecanică a suprafeței luminale, îndepărtarea cu un cateter sub formă de balon care se deplasează în interiorul vasului, preparate „Häutchen" de atașare a endoteliului pe filtre Millipore sau acetat de celuloză, digestii enzimatice, în special cu colagenază, desprinzînd endoteliul de membrana bazală etc.

În cercetările noastre, celulele endoteliale au fost detașate din preparate de intima+media din aorta toracică și abdominală de iepure, din vena cavă abdominală și vena jejunală, precum și din valvulele cardiace atrioventriculare și sigmoide (45).

S-a utilizat procedeul, descris de Wechezak și Mansfield (46), de incubare a țesutului în EDTA 0,53 mM, urmărind prin microscopie optică în contrast de fază aspectul stratului celular desprins. Celulele endoteliale s-au desprins în fișii compacte, menținînd un aspect asemănător dispoziției „in vivo" (fig. 3, 4 și 5).

PG celulelor endoteliale izolate au fost degradați enzimatic cu papaină și pronază, procedeu urmat de îndepărtarea proteinelor și precipitarea GAG cu etanol absolut. Identificarea speciilor moleculare de GAG s-a făcut prin electroforeză pe acetat de celuloză, prin comigrare față de standarde.

Separarea electroforetică în piridină—acid formic indică o bandă de HS și ChS cu migrare mai scăzută față de cea a standardelor (fig. 6).

În tampon piridină—acid formic, pH 3, migrarea electroforetică se realizează în funcție de gradul de sulfatare al GAG; HS și ChS celulelor endoteliale avînd o migrare mai scăzută față de standarde, aceasta indică un grad mai redus de sulfatare, fapt menționat și de Winterbourne și

colab. (47). HS din CE aortice bovine posedă 0,4 grupări N-sulfat şi 0,2 grupări O-sulfat per dizaharid, faţă de 0,97 grupări sulfat per dizaharid conţinut de HS din plămîn bovin utilizat ca standard.

Biosinteza PG şi GAG celulelor endoteliale s-a urmărit pe culturi celulare (de exemplu, din aorta toracică) cultivate în prezenţă de precursori radioactivi (de exemplu, 5 μCi/ml $^{35}SO_4^{2-}$). CE încorporează trasorul în GAG pericelulari, extracelulari şi intracelulari.

Încorporarea creşte în timp după o curbă hiperbolică. Identificînd speciile moleculare de GAG din cele trei compartimente, se constată preponderenţa HS, urmată de ChS. Conţinutul de DS este remarcabil de mic. Totodată, proporţia relativă de HS este maximă în compartimentul peri- şi intracelular, comparativ cu cel extracelular, ceea ce probează asocierea HS cu membranele celulare (48).

Ca o concluzie a studiilor asupra PG-HS ai celulelor endoteliale, prezenţa acestora a fost evidenţiată în două compartimente :

1) la suprafaţa luminală a membranei celulare, probabil intercalat în membrana plasmatică. Prin activitatea antitrombinică a unor oligozaharide din lanţul de HS al moleculei se sugerează ideea rolului PG de HS de la suprafaţa luminală în menţinerea fluidităţii sîngelui. O altă ipoteză este aceea că PG de HS leagă anumite proteine de interes biologic, prezente la suprafaţa endoteliului, care sînt fie sintetizate de endoteliu, fie transportate pe cale sanguină (28), (49) ;

2) la suprafaţa bazală a celulelor, unde poate fi implicat în adeziunea celulară, menţinînd o barieră de permeabilitate pentru endoteliu (50).

IV. PARTICIPAREA PROTEOGLICANILOR ŞI GLICOZAMINOGLICANILOR ÎN PROCESE CELULARE FUNDAMENTALE

1. INTERACŢIUNILE CELULĂ—CELULĂ

În medierea interacţiunilor celulă—celulă pare a fi implicat în special HA. Am arătat mai înainte că celulele 3T3 şi SV3T3 leagă la suprafaţă ^3H—HA (34). Legarea are loc la receptori pentru HA din membrana celulară. Pornind de la această constatare, s-a emis ipoteza adeziunii celulă la celulă prin intermediul HA, astfel că HA din glicocalixul unei celule se poate lega la receptorii liberi de la celula adiacentă. Ipoteza este menţinută de două observaţii experimentale : degradarea cu hialuronidază a HA pericelular nu mai face posibilă adeziunea celulă—celulă, iar procesul de adeziune este inhibat în prezenţa excesului de HA exogen, care ocupă toţi receptorii suprafeţei celulare.

Este posibil ca o situaţie similară să aibă loc „in vivo", în celulele embrionare, bogate în HA. La concentraţii mari de HA, sînt facilitate deplasările celulare, celulele fiind împiedicate să adere unele de altele în structuri cvasiimobile, caracteristice celulelor diferenţiate.

2. INTERACŢIUNILE CELULĂ — SUBSTRAT

În interacţiunile celulă—substrat intervin HA şi PG sulfataţi.

Prezenţa HA în centrii de adeziune a fost demonstrată prin degradarea acestor centri, urmată de detaşarea celulelor, în prezenţa hialuronidazei. În general, celulele cu adeziune scăzută la substrate au mai mult HA decît cele cu ataşare puternică, fapt care sugerează rolul HA în scăderea adeziunii celulelor la substrate.

Aderiunile focale (contacte specializate dintre celule și substrat) conțin HA și PG de HS (51) și de ChS (52).

Există diferențe în compoziția PG aderiunilor focale, în funcție de timpul de la atașarea inițială a celulelor pînă la maturarea completă a acestora, asociate deplasărilor celulare. În acest proces crește conținutul de HA și de PG de HS și ChS, dar scade dimensiunea moleculelor de HS.

Este interesantă de menționat comportarea PG membranari ai celulelor tumorale. Astfel, PG de ChS produși de celulele tumorale L-2 inhibă atașarea celulelor tumorale la FN și colagen de tip I. Ca urmare, deplasările invadatoare ale celulelor tumorale sînt lipsite de restricția interacțiunii cu componentele matricei extracelulare, compusă din FN și colagen de tip I.

PG de ChS produși de aceste celule tumorale nu interacționează însă cu colagenul de tip IV, fapt care poate avea un rol deosebit în abilitatea celulelor metastatice de a traversa membranele bazale (53).

3. PROLIFERAREA CELULARĂ

Rolul PG de HS în reglarea inhibiției de contact a proliferării celulare a fost cercetat de Matuoka și Mitsui (54). Adaosul unei concentrații mari de HS la mediul de cultură al fibroblastelor în cultură produce inhibarea creșterii acestora.

Similar, în cursul îmbătrînirii culturii, crește cantitatea de HS asociat suprafeței, astfel încît în pasajele finale se produce inhibarea proliferării celulare și pe această cale.

4. CICLUL CELULAR

PG de la suprafața membranei celulare prezintă variații în funcție de ciclul celular, proces care nu se constată și la PG asociați membranelor interne ale celulelor.

Lucrînd pe fibroblaste embrionare Balb/c, Otto și Mühlardt (55) atestă sinteză și secreție de PG în cursul fazei G_2 sau M a ciclului de creștere. Celulele care prezintă o diviziune intensă sintetizează în special ChS, pe cînd spre sfîrșitul perioadei de cultivare se sintetizează mai ales HS, puternic sulfatat.

În cazul celulelor liniei CHO, faza G_1 a ciclului celular este caracterizată prin sinteză intensă de HS la suprafața membranei; în faza premitotică se diminuează concentrația de HS membranar datorită, probabil, eliberării acestuia în mediul de creștere (56).

5. MORFOGENEZĂ

Morfogeneza este însoțită de modificări ale compoziției matricei extracelulare, inclusiv PG sau GAG componenți. Aceste molecule intervin în toate evenimentele care se produc în morfogeneză : adeziune, recunoaștere, modificare de formă, proliferare și deplasare.

În legătură cu rolul GAG în morfogeneză s-au făcut trei tipuri de studii : (1) studii descriptive, care corelează modificările unei anumite specii moleculare de GAG și ale concentrației sale cu procesele morfogenetice (de exemplu, rolul GAG în morfogeneza inimii) (12); (2) studii experimentale asupra relației dintre GAG specifici unei anumite comportări a celulelor și analiza biochimică a mecanismelor care controlează aceste relații; (3) studii experimentale „in vitro", care probează rolul GAG în evenimentele celulare.

În general, în țesuturile în dezvoltare se acumulează HA de-a lungul căilor de migrare ale celulelor mezenchimale. În cursul diferențierii ulterioare, HA este înlocuit de PG sulfatați.

V. CONCLUZII

Lucrarea cuprinde numai cîteva din rezultatele cercetărilor asupra organizării PG și GAG la nivelul membranelor celulare, distribuției acestora în raport cu membrana celulară și speciilor de PG asociați specific membranei celulare.

Sînt exemplificate totodată proprietățile PG celulelor endoteliale.

În sfîrșit, structura chimică specifică a PG, caracterul polianionic puternic și interacțiunile cu alte macromolecule ale matricei extracelulare (colagen, fibronectină) fac posibilă participarea acestor compuși membranari în interacțiunile celulare fundamentale.

Mulțumiri. Autoarea mulțumește prof. dr. N. Simionescu și dr. M. Simionescu pentru îndemnul constant și discuțiile stimulatoare care au condus la aprofundarea acestui domeniu de lucru.

Prezentat la redacție la 28 septembrie 1984

Institutul de biologie și patologie celulară
București, str. B. P. Hașdeu nr. 8

BIBLIOGRAFIE

1. B. ALBERTS, D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, J. D. WATSON, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publ. Inc., 1983, p. 702.
2. L. ROSENBERG, *Dynamics of Connective Tissue Macromolecules*, sub red. M. BURLEIGH, R. POOLE, North-Holland Publ., Amsterdam, 1975, p. 105.
3. V. C. HASCALL, G. K. HASCALL, în *Cell Biology of the Extracellular Matrix*, sub red. E. D. HAY, Plenum Publ. Corp., 1981, p. 39.
4. K. MURATA, K. NAKAZAWA, A. HAMAI, Atherosclerosis, **21**, 93 (1975).
5. O. M. S. TOLEDO, P. A. S. MOURAO, Artery, **6**, 341 (1980).
6. T. R. OEGEMA, V. C. HASCALL, R. EISENSTEIN, J. Biol. Chem., **254**, 1312 (1979).
7. P. LEVY, J. PICARD, Eur. J. Biochem., **61**, 613 (1976).
8. R. J. BOUCEK, N. L. NOBLE, D. E. WELLS, Circul. Res., **39**, 828 (1976).
9. D. POPOV, D. ALEXANDRU, Poster, Workshop on "Cell Biology of the Vessel Wall", August 25–27, 1983.
10. N. HATA, Y. NAGAI, Anal. Biochem., **45**, 462 (1972).
11. B. RADHAKRISHNAMURTHY, S. R. SRINIVASAN, P. VIJAYAGOPAL, E. R. DALFERES, G. S. BERENSON, *Glycosaminoglycans and Proteoglycans in Physiological and Pathological Processes*, sub red. R. S. VARMA, R. VARMA, S. Karger, Basel, 1982, p. 231.
12. A. HONDA, Y. KANKE, Y. MORI, J. Biochem., **81**, 1591 (1977).
13. R. R. MARKWALD, F. M. FUNDERBERG, D. H. BERNANKE, Texas Rep. Biol. Med., **39**, 253 (1979).
14. Y. S. KANWAR, M. G. FARQUHAR, J. Cell Biol., **81**, 137 (1979).
15. K. C. POON, P. L. SANNES, J. A. V SIMSON, S. S. SPICER, Histochem. J., **13**, 23 (1981).
16. G. QUANTARELLI, R. ZITO, J. A. CIFONELLI, J. Histochem. Cytochem., **19**, 641 (1971).
17. A. RUGGERI, C. DELL'ORBO, D. QUACCI, Histochem. J., **7**, 187 (1975).
18. K. LAPIS, J. TIMAR, Biol. Cell., **39**, 209 (1980).
19. R. DIERICHS, Histochemistry, **64**, 171 (1979).
20. M. HORNUNG, J. WOLLENSAK, Graefes Arch. Ophthalmol., **211**, 67 (1979).
21. T. M. RICHARDSON, Invest. Ophthalmol. Visual Sci., **22**, 319(1982).
22. N. SIMIONESCU, M. SIMIONESCU, G. E. PALADE, J. Cell Biol., **83**, part 2, p. 78 a, CS 292 (Abstr.).
23. M. SIMIONESCU, *Structural and functional differentiation of microvascular endothelium* în *Blood Cells and Vessel Walls: Functional Interactions*, Ciba Found. Symp., **71**, 1980, p. 39.

24. N. SIMIONESCU, *Transcytosis and traffic of membranes in the endothelial cells*, in *International Cell Biol. 1980—1981*, sub red. H. G. SCHWEIGER, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p. 657.
25. M. SIMIONESCU, N. SIMIONESCU, J. Cell Biol., **70**, 608(1976).
26. C. T. SINGLEY, M. SOLURSH, Histochemistry, **65**, 93 (1980).
27. M. HÖÖK, J. ROBINSON, L. KJELLEN, S. JOHANSSON, *Extracellular Matrix*, Academic Press, New York-London, 1982, p. 15.
28. A. OLDBERG, E. G. HAYMAN, E. RUOSLAHTI, J. Biol. Chem., **256**, 10847(1981).
29. V. BUONASSISI, P. COLBURN, Biochim. Biophys. Acta, **760**, 1 (1983).
30. N. TODA, A. DOI, A. JIMBO, I. MATSUMOTO, N. SENO, J. Biol. Chem., **256**, 5345 (1981).
31. H. NAKADA, I. FUNAKOSHI, I. YAMASHIMA, Biochem. Biophys. Res. Commun., **79**, 280 (1977).
32. T. SUGANUMA, S. SUZUKI, S. TSUYAMA, F. MURATA, Acta Histochem. Cytochem., **14**, 534 (1981).
33. D. POPOV, Rev. Roum. Biochim., **21**, 67 (1984).
34. B. P. TOOLE, Conn. Tiss. Res., **10**, 93 (1982).
35. A. OLDBERG, L. KJELLEN, M. HÖÖK, J. Biol. Chem., **254**, 8505 (1979).
36. K. G. VOGEL, J. DOLDE, Biochim. Biophys. Acta, **552**, 194 (1979).
37. Y. OHKUBO, I. FUNAKOSHI, I. YAMASHINA, J. Biochem., **89**, 161 (1981).
38. S. R. DELANEY, H. E. CONRAD, Biochem. J., **209**, 315 (1983).
39. P. M. KRAEMER, D. A. SMITH, Biochem. Biophys. Res. Commun, . **56**, 423 (1974).
40. A. C. RAPRAEGER, M. BERNFIELD, J. Biol. Chem., **258**, 3632(1983).
41. S. BJÖRNSSON, D. HEINEGARD, Biochem. J., **197**, 249 (1981).
42. L. M. HIEBERT, L. B. JAQUES, Artry, **2**, 26 (1976).
43. J. GORMSEN, H. O. KRUSE-BLINKENBERG, Scand. J. Haematol., Suppl., **34**, 52 (1979)
44. H. ENGELBERG, Amer. Heart J., **99**, 359 (1980).
45. D. POPOV, D. ALEXANDRU, Bul. Soc. Nat. Biol. Cel., **3**, 13 (1984).
46. A. R. WECHEZAK, P. B. MANSFIELD, In Vitro, **9**, 39 (1973).
47. D. J. WINTERBOURNE, A. M. SCHOR, J. T. GALLAGHER, Eur. J. Biochim., **135**, 271 (1983).
48. G. GAMSE, H. G. FROMME, H. KRESSE, Biochim. Biophys. Acta, **544**, 514 (1978).
49. U. LINDAHL, M. HÖÖK, Ann. Rev. Biochem., **47**, 385 (1978).
50. Y. S. KANWAR, M. G. FARQUHAR, Fed. Proc., **39**, 334 (1980).
51. H. RAUVALA, Trends in Biochem. Sci., **8**, 323 (1983).
52. K. HEDMAN, S. JOHANSSON, T. VARTIO, L. KJELLEN, A. VAHERI, M. HÖÖK, Cell, **28**, 663 (1982).
53. M. J. BRENNAN, A. OLDBERG, E. G. HAYMAN, E. RUOSLAHTI, Cancer Res., **43**, 4302 (1983).
54. K. MATUOKA, Y. MITSUI, Cell Structure and Function, **6**, 23 (1981).
55. A. M. OTTO, P. F. MÜHLARDT, J. Supramol. Struct., **13**, 281 (1980).
56. P. M. KRAEMER, R. A. TOBEY, J. Cell Biol., **55**, 713 (1972).

MIOARA CÂRSTEANU

(1930—1984)

În dimineaţa zilei de 6 august 1984, s-a stins prematur din viaţă doctor Mioara Cârsteanu, una dintre biochimistele române cunoscute mai ales datorită contribuţiilor aduse domeniului mai puţin investigat al biochimiei pielii.

S-a născut la 22 noiembrie 1930, la Bucureşti. După absolvirea claselor primare, urmează cursurile Şcolii Centrale de fete din Bucureşti, iar apoi, din anul 1948, Facultatea de chimie din Bucureşti, secţia biochimie. Terminarea facultăţii în anul 1952 coincide cu anul inaugurării Institutului de biochimie al Academiei R. P. Române, unde este repartizată împreună cu alţi cîţiva colegi de serie. Institutul, condus de acad. E. Macovschi, devine o adevărată şcoală de formare a tinerelor cadre de specialişti, între care şi Mioara Cârsteanu, a cărei activitate ulterioară a dovedit înclinarea deosebită pe care o avea către munca de cercetare ştiinţifică. În activitatea sa a abordat diferite şi interesante domenii de biochimie. Astfel, dintre primele cercetări pot fi amintite cele legate de studiul naturii materiei vii prin intermediul coacervatelor — de mare actualitate în acea vreme — , care serveau ca model simplificat pentru dezlegarea unor probleme legate de originea vieţii pe pămînt. Pe această linie cercetează activitatea reacţiilor enzimatice în coacervate şi medii heterogene, iar rezultatele obţinute au făcut obiectul unor lucrări prezentate la Simpozionul desfăşurat la Moscova în 1957, care a avut ca subiect „Originea vieţii pe pămînt".

În continuare, preocupările Mioarei Cârsteanu se îndreaptă spre domeniul biochimiei pielii, preocupări ce vor face şi obiectul tezei de doctorat de mai tîrziu.

Ca urmare a cercetărilor efectuate în acest domeniu se desprind nenumărate rezultate importante de ordin teoretic şi practic, dintre care amintim : studiul biochimismului proteic din piele în diferite boli de piele cu etiologie necunoscută, contribuţii privind modificări comune la nivelul biosintezei proteinelor din piele în boli cu manifestări deosebite,

posibilitatea de diagnostic precoce în dermitele de contact ale pielii și în diferite afecțiuni ale exocolului uterin prin determinarea exosmozei electroliților la nivelul acestora, posibilitatea de urmărire a corticoterapiei generale aplicate în diferite boli ale pielii prin urmărirea exosmozei electroliților din piele, aspecte ale biochimismului pielii la diferite vertebrate ș.a.

Ca o dovadă a diversității preocupărilor și a receptivității pentru nou, pot fi amintite, spre exemplificare, și lucrările legate de testarea unor noi schimbători de ioni acizi și bazici pe bază de agaroză, elaborate la Institutul de biochimie, urmărind aspectul proteinelor sarcoplasmatice în filogenie, apoi cele legate de un domeniu nou și modern al enzimologiei, cum este cel al enzimelor imobilizate, sau preocupările din domeniul identificării și caracterizării unor alcaloizi de interes medical.

Paralel cu activitatea sa de cercetare, Mioara Cârsteanu a depus și o remarcabilă activitate didactică. Astfel, în perioada 1953—1958 a funcționat ca asistentă la Catedra de chimie generală a Facultății de medicină din București, în cadrul căreia a efectuat lucrări practice și seminarii, ținînd bilunar și cursuri, iar semestrial colocvii cu studenții. În cadrul Institutului de biochimie a răspuns de practica de vară a studenților facultăților de chimie, biologie și biofizică de la Universitatea din București, ținînd totodată și o serie de prelegeri cu subiecte de specialitate. De asemenea a condus munca de documentare și lucrările practice ale mai multor studenți de la Facultatea de biologie, necesare pentru tezele lor de diplomă.

În cursul activității științifice depuse în cadrul Institutului de biochimie, a participat cu lucrări la numeroase congrese și simpozioane de specialitate din țară și străinătate.

Începînd din anul 1978 și pînă la deces, dr. Mioara Cârsteanu și-a desfășurat activitatea în cadrul Institutului de fizică și inginerie nucleară în mijlocul unui colectiv de biofizică și radiobiologie, unde a depus o muncă de înaltă ținută științifică în domeniul cercetării efectelor iradierii cu neutroni asupra unor structuri biologice și în studii de radioprotecție.

În afara lucrărilor științifice publicate în reviste de specialitate, Mioara Cârsteanu a fost autoarea unor studii monografice cum sînt „Biochimia pielii", lucrare apărută în Editura medicală în 1976, căreia i-a fost acordat premiul Academiei pe anul 1978, și „Colagenul — biochimie și fiziologie", apărută în Editura Academiei R. S. România în 1982.

Ca semn de recunoaștere a valorii științifice pe care o reprezintă, Mioara Cârsteanu a făcut parte, din 1973, din Consiliul de conducere al Uniunii Societăților de Științe Medicale, secția de biochimie.

Pentru toți cei ce au cunoscut-o pe dr. Mioara Cârsteanu, ea rămîne ca o persoană de o energie ieșită din comun, bună colegă, gata să sprijine, în măsura posibilităților, pe oricine apela la ea pentru rezolvarea problemelor de ordin profesional sau personal. A întîmpinat cu demnitate boala cumplită care a răpus-o, continuînd să se dedice cu dragoste și pasiune, cu ultimele resurse de viață, familiei și profesiei pînă în momentul plecării ei dintre noi.

Pentru cadrele tinere de cercetători a căror muncă a coordonat-o în ultimii ani va rămîne un exemplu demn de urmat.

Horst D. Schell

LISTA DE LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE ȘI CĂRȚI, ÎN ORDINE CRONOLOGICĂ

1. *Prepararea din spermă a hialuronidazei brute sub formă de praf*, Com. Acad. R.P.R., **5**, 1463 (1955), în colaborare cu E. Macovschi.
2. *Acțiunea ureazei și β-amilazei asupra ureei, respectiv amidonului, în prezența unor coacervate gluco-proteice*, St. cerc. biochim., **1**, 297 (1958); Rev. Chim. Acad. R.P.R., **2**, 280 (1957); Com. Acad. R. P. R., **7**, 933 (1957), în colaborare cu E. Macovschi și S. S. Vasu.
3. *Acțiunea lecitinei asupra membranei lichide alcool izoamilic—apă pentru veronal*, St. cerc. biochim., **1**, 355 (1958).
4. *Coacervatul dintre proteinele serului sanguin uman și guma arabică*, St. cerc. biochim., **2**, 111, (1959), în colaborare cu E. Macovschi.
5. *Acțiunea benzidinei și a medinalului asupra activității unor enzime din țesuturile animale*, St. cerc. biochim., **4**, 265 (1961), în colaborare cu S. S. Vasu și Corina Sarmanioti.
6. *Influența coacervatului ser—gumă arabică asupra activității catalazei hepatice de cal și a catalazei extrase din grîu*, St. cerc. biochim., **5**, 39 (1962).
7. *Influența hiperemiei experimentale, timpului și temperaturii asupra exosmozei electroliților din pielea umană normală*, St. cerc. biochim., **6**, 255 (1963).
8. *Metodă pentru determinarea exosmozei electroliților din colul uterin*, St. cerc. biochim., **7**, 151 (1964); Rev. Roum. Biochim., **1**, 119 (1964), în colaborare cu E. Macovschi și Alexandrina Popescu.
9. *Exosmoza sodiului, potasiului și calciului din pielea umană normală*, St. cerc. biochim., **8**, 177 (1965).
10. *Explorarea exocolului uterin prin exosmoza electroliților*, St. cerc. biochim., **8**, 221 (1965); Rev. Roum. Biochim., **2**, 149(1965), în colaborare cu Alexandrina Popescu.
11. *Exosmoza sodiului, potasiului și calciului din pielea umană în diferite stări patologice*, St. cerc. biochim., **9** , 262 (1966).
12. *Acțiunea corticoterapiei generale asupra exosmozei sodiului, potasiului și calciului din pielea umană în diferite stări patologice*, St. cerc. biochim., **10**, 99 (1967).
13. *Exosmoza sodiului, potasiului și calciului în exocolul uterin normal și patologic*. St. cerc. biochim., **10**, 199 (1967), în colaborare cu Alexandrina Popescu.
14. *Exosmoza electroliților din pielea aparent sănătoasă a bolnavilor cu dermatoze alergice profesionale*, Fiziol. norm. patol., **1**, 57 (1967), în colaborare cu R. Dumitriu.
15. *The exosmosis of free aminoacids from normal human skin*, Rev. Roum. Biochim., **5**, 107 (1968), în colaborare cu R. Dimitriu.
16. *Exosmoza aminoacizilor liberi din pielea vertebratelor în scară filogenetică*, St. cerc. biochim., **13**, 31 (1970).
17. *Influența vitaminei B_{12} asupra exosmozei electroliților din piele în vitiligo și psoriazis*, St. cerc. biochim., **13**, 243 (1970).
18. *Exosmosis of free aminooacids from human skin in sclerodermia and lupus erythematosus*, Rev. Roum. Biochim., **7**, 91 (1970), în colaborare cu R. Dimitriu.
19. *Unele aspecte ale biochimismului pielii la diferite vertebrate*, St. cerc. biochim., **14**, 361 (1971).
20. *Some aspects of collagen metabolism in human skin with sclerodermia and lupus erythematosus*, Rev. Roum. Biochim., **8**, 197 (1971), în colaborare cu R. Dimitriu.
21. *Some aspects of aminoacids metabolism from human skin in psoriasis*, Rev. Roum. Biochim., **9**, 3 (1972), în colaborare cu R. Dumitriu.
22. *Cromatografia pe coloană de schimbători de ioni bazici derivați de la agaroză a proteinelor musculare în filogenie*, St. cerc. biochim., **15**, 211 (1972), în colaborare cu H. D. Schell.
23. *Aspects of some biochemical processes in human skin with psoriasis*, Rev. Roum. Biochim., **3**, 201 (1972), în colaborare cu R. Dimitriu.
24. *Some modifications concerning the exosmosis of peptides, free aminoacids and ions from skin in toxidermia*, Rev. Roum. Biochim., **11**, 1 (1974).
25. *Cromatografia pe coloană de carboximetilagaroză a proteinelor sarcoplasmatice și evoluția acestora în filogenie*, St. cerc. biochim., **17**, 1 (1974), în colaborare cu H. D. Schell.
26. *Proteinele din stratul cornos exfoliat al enzimelor de psoriazis*, St. cerc. biochim., **3**, 247 (1974).
27. *Influența nutriției minerale asupra conținutului în alcaloizi tropanici din Datura inoxia*, St. cerc. biochim., **19**, 1 (1976), în colaborare cu H. D. Schell, Lora Scolnic, A. Nasta, Irina Cornoiu.

28. *Imobilizarea aldolazei prin legarea covalentă de CM-agaroză legată încrucișat și proprietățile fizico-chimice și catalitice ale conjugatului enzimatic insolubil obținut*, St. cerc. biochim., **20**, 1 (1977), în colaborare cu H. D. Schell, Lora Scolnic.
29. *Effect of whole body irradiation with neutrons on haemoglobin*, Rev. Roum. Biol., Série Biol. Anim., **25**, 2 (1980), în colaborare cu C. Vlădescu, E. Iancu.
30. *Contribution to the study of radiobiological effects of neutrons*, Rev. Roum. Biol., Série Biol. anim., **25**, 1 (1981).
31. *Biochimia pielii*, Edit. medicală, București, 1976, în colaborare cu Radu Dimitriu, Premiul Academiei 1978.
32. *Colagenul — biochimie și fiziologie*, Edit. Academiei, București, 1982, în colaborare cu C. Vlădescu.
33. *Exosmoza electroliților din piele și exocolul uterin în cazuri normale și patologice*, teză de doctorat, București, 1969.

I. ANGHEL, VICTORIA HERLEA, N. TOMA, *Drojdiile. Taxonomie ecologie, citologie, genetică* Edit. Academiei, Bucureşti, 1984, 222 p.

Studiul monografic „Drojdiile", recent apărut în Editura Academiei reprezintă prima lucrare consacrată acestei probleme în literatura de specialitate din ţara noastră. Monografia este rodul colaborării a trei eminenţi specialişti, cu o îndelungată şi recunoscută activitate în domeniul citologiei, geneticii şi taxonomiei acestui important grup de microorganisme. Aria de interes pentru studiul lor, limitată iniţial la unele fermentaţii tradiţionale, s-a extins în ultimii ani datorită perspectivei utilizării tot mai largi, ca sursă industrială de proteine, vitamine, aminoacizi etc. în cadrul revoluţiei biotehnologice, care va avea un impact deosebit asupra vieţii economice şi sociale. În acelaşi timp, drojdiile au devenit treptat un tot mai interesant obiect de studiu al biologiei fundamentale, datorită interesului pentru organizarea celulară, biochimia şi genetica lor şi în general, ca model experimental pentru cercetările consacrate organismelor de tip eucariot. Cele patru capitole ale lucrării : „Taxonomia", „Ecologia" (dr. Victoria Herlea), „Citologia" (prof. I. Anghel şi dr. N. Toma) şi „Genetica" (prof. I. Anghel), elaborate sub coordonarea profesorului dr. I. Anghel, reputat specialist în domeniul citologiei şi geneticii drojdiilor sînt redactate într-o concepţie unitară, într-un stil clar şi la un înalt nivel ştiinţific. Lucrarea beneficiază de o bibliografie amplă şi modernă şi de experienţa şi competenţa unanim recunoscută a autorilor. Materialul ilustrativ, în bună parte original (microscopie electronică cu transmisie şi cu tehnica de îngheţare—fractuare), este foarte bine ales şi adecvat înţelegerii problemelor de structură internă, care au suferit profunde mutaţii în ultimele decenii datorită tehnicilor moderne de investigaţie. În ansamblu, monografia reprezintă o contribuţie deosebit de valoroasă la studiul acestor importante microorganisme.

În concluzie, considerăm că monografia „Drojdiile" reprezintă o lucrare exemplară, de mare utilitate teoretică şi practică, menită să satisfacă o categorie largă de specialişti din domeniul microbiologiei generale, geneticii, citologiei, precum şi din diferite laboratoare medicale şi unităţi industriale de producţie.

G. Zarnea

S. PFEIFER, P. PFLEGEL, N. N. BORCHERT, *Grundlagen der Biofarmazie* (Bazele biofarmaciei), VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1984, 352 p.

Biofarmacia studiază interdependenţa dintre proprietăţile fizice, fizico-chimice ale substanţelor şi formelor farmaceutice de administrare şi condiţiile morfo-fiziologice ale organismului pe de o parte, şi absorbţia, distribuţia, biotransformarea şi eliminarea acestora, pe de altă parte.

Punctul central este biodisponibilitatea în interdependenţă cu problemele adiacente : determinarea valorii acesteia şi factorii care o influenţează.

În continuare sînt discutate aspectele farmacocinetice şi biotransformarea.

Cartea, scrisă pentru studenţii şi participanţii în farmacie, cuprinde 8 capitole, în care sînt discutate aspectele principale ale domeniului nou al biofarmaciei, apărut după anul 1960.

Primul capitol tratează formarea şi dezvoltarea noţiunii de biofarmacie în urma constatărilor făcute asupra importanţei formei de administrare a medicamentelor şi nu numai a raportului medicament/doză. Apare astfel noţiunea de biodisponibilitate, dependentă de viteza de eliberare a substanţei active din forma condiţionată, iar din partea organismului de absorbţie şi retenţie.

Următoarele trei capitole discută bazele fiziologice şi morfologice ale biodisponibilităţii, principiile de bază ale transportului substanţelor în organism la diferite nivele, eliberarea, absorbţia. distribuţia şi eliminarea acestora.

Capitolul 5 abordează problema analizei farmacocinetice, istoria, scopul şi importanţa.

Capitolul 6 se ocupă pe larg de noţiunea de biodisponibilitate, evoluţia şi definiţia noţiunii, factorii care o influenţează (fiziologici, biochimici, proprietăţile fizico-chimice ale substanţelor, mărimea particulelor, stabilitatea chimică, forma de administrare.

În continuare sînt expuse metodele de determinare ale biodisponibilităţii, acţiunii farmacologice şi terapeutice, concentraţiei substanţei active în sînge, plasmă, ser, urină, prin metode „in vitro" şi „in vivo". S-au stabilit corelaţii între determinările „in vitro" şi „in vivo" şi s-au trasat curbe.

Capitolul 7 trasează biotransformarea substanţelor medicamentoase pe baze chimice, biochimice şi biologice. Se discută şi alte aspecte în legătură cu biotransformarea : rolul enzimelor,

bioritmul, relația dintre biotransformare și acțiunea medicamentului, metaboliți, precum și biotransformarea dependentă de doza administrată.

Ultimul capitol se ocupă de factorii care influențează biotransformarea : vîrsta, starea de boală, distribuția, interacțiunile farmacodinamice etc.

Materialul prezentat în această carte este util pentru practica studenților în farmacie și servește intereselor științifice și practice ale medicilor, farmaciștilor și pacienților. Cunoașterea principiilor biofarmaciei și a informațiilor oferite de farmacocinetică asupra biodisponibilității și biotransformării permite o folosire mai eficientă a medicamentelor.

Teodora Vâlsănescu

E. GOLOVINSKY, *Biochemie der Antimetabolite* (Biochimia antimetaboliților), VEB Gustav-Fischer Verlag, Jena, 1984, 226 p.

Cartea lui E. Golovinsky, amplă monografie asupra antimetaboliților, prezintă o vedere de ansamblu asupra cunoștințelor actuale, posibilitățile multiple de sintetizare a unor noi antimetaboliți, și de utilizare a acestora în știință și practică.

Metodele moderne ale biochimiei și biologiei moleculare au permis studiul mecanismului de acțiune al metaboliților, substanțe indispensabile existenței și funcționării organismelor vii și antimetaboliților, analogi structurali și antagoniști funcționali ai acestora. Cercetările au arătat că antimetaboliți acționează ca inhibitori (antagoniști) ai metaboliților, înlocuindu-i pe aceștia în unele funcții vitale prin legarea (reversibilă sau ireversibilă) de situdsul activ al substratului. Analogia structurală permite concurența (competitivitatea) față de centrul activ al substratului ; deosebirile mici de structură chimică sînt însă esențiale pentru a împiedica înlocuirea metabolitului în îndeplinirea funcției sale biologice.

Pe baza acestui mecanism de acțiune se proiectează modele structurale de antimetaboliți cu acțiune dirijată, la ora actuală fiind pe prim plan obținerea antagoniștilor bazelor pirimidinice și purinice cu efecte antitumorale, antivirale și imunosupresoare.

Cartea începe cu o parte generală, care cuprinde patru capitole, sinteza dirijată a antimetaboliților.

Primul capitol cuprinde un scurt istoric asupra etapelor de dezvoltare ale problemei, definițiile noțiunilor de metabolit și antimetabolit, relația structură chimică—activitate biologică, regulile generale de obținere a metodelor structurale ale antimetaboliților țintă, stabilite de Woolley (1952) în lucrarea sa asupra metaboliților :

— Metode de identificare a acțunii antimetaboliților discută : cinetica inhibării reacțiilor enzimatice, analiza inhibitorilor, concurența analogilor structurali la nivel celular. Se indică metode microbiologice, culturi de celule și țesuturi („in vivo") pentru studierea mecanismelor de acțiune.

— Mecanisme biochimice de acțiune ale antimetaboliților, cu aspecte privind competența substanțelor cu structuri asemănătoare la situsul de legare al enzimei, inhibitori alosterici, analogi ai pirimidinei și purinei, aminoacizi, acțiunea mutagenă a bazelor pirimidinice și purinice.

— Degradarea și detoxifierea antimetaboliților, generalități, exemplificări în cazul sulfamidelor, acidului folic, analogilor pirimidinici și purinici.

Partea specială prezintă diferite grupe de antimetaboliți importanți pentru practică, între care se remarcă medicamentele chimioterapice. În legătură cu acestea se discută principiul toxicității selective, rezistența și mijloacele de combaterea acesteia.

Ca antimetaboliți de perspectivă, punct central al construcției modelelor structurale dirijate, sînt analogii pirimidinici și purinici proiectați în vederea obținerii unor antimetaboliți cu acțiune antitumorală, antivirală și imunosupresoare.

Monografia lui E. Golovinsky este deosebit de valoroasă deoarece redă, într-o formă concisă, toate aspectele și realizările cercetării antimetaboliților.

Cartea este de un nivel științific ridicat și folosește cele mai noi cunoștințe teoretice și practice în domeniul chimiei, biologiei și al unor discipline medicale.

Teodora Vâlsănescu

Methods of Protein Analysis (Metode de analiză a proteinelor), sub red. I. KERESE, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1984, 270 p.

Dezvoltarea rapidă a aparaturii și a tehnicilor de lucru în ultimii 30 de ani a condus la o expansiune fără precedent a cercetării biochimice.

Dacă în perioada lui Fischer, pentru determinarea compoziției în aminoacizi, erau necesare 100 g substanță, iar analiza dura o lună, astăzi, pornind de la 10—20 μg de hidrolizat proteic un analizor de aminoacizi de înaltă presiune va da rezultatul în 70 min, cu o eroare de ± 1%. Aceste metode noi au permis izolarea rapidă a celor mai variate proteine și stabilirea structurii lor.

Lucrarea de față prezintă într-un mod concis și foarte bine documentat metodele și tehnicile de lucru utilizate în studiul proteinelor de diverse origini și cu variate compoziții. Autorii au selecționat metodele care pot fi folosite în majoritatea laboratoarelor de biochimie, fiind evitate tehnicile fine de analiză a proteinelor, care pot fi utilizate în institutele specializate în studiul structurii proteinelor.

Lucrarea începe cu descrierea, etapă cu etapă, a producerii de analiză a diverselor substanțe, insistînd asupra problemelor ce intervin și trebuie rezolvate în cadrul fiecărui tip de analiză. În acest fel, lucrarea se constituie într-un ghid sistematic pentru analist, acoperind cele mai importante tehnici : electroforeza. cromatografia prin schimb ionic, gel-cromatografia și cromatografia în strat subțire.

Prin conținutul ei, lucrarea se adresează atît biochimiștilor, cît și analiștilor din diverse domenii.

Junona Colceag

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 33 ; *Polynuclear Aromatic Compounds*, Part 2 : *Carbon Blacks, Mineral Oils and Some Nitroarenes* (Monografiile IARC asupra evaluării riscului carcinogenic al substanțelor chimice în om, vol. 33 : Compuși polinucleari, partea a 2-a Negrul de fum, uleiurile minerale și unele nitroarene), Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1984, 245 p.

Volumul sintetizează lucrările sesiunii care a avut loc în perioada 7—14 iunie 1983 la Lyon. Este al doilea volum dintr-o serie de patru volume în care se evaluează riscul cancerigen al unor compuși aromatici polinucleari. Sînt prezentate uleiuri minerale, negru de fum și unele nitroarene, luîndu-se în considerare în special acțiunea amestecurilor complexe de substanțe aromatice asupra animalelor și asupra omului. Fiecare produs este studiat în patru secțiuni : date chimice și fizice despre produs ; producția comercială, folosire, analiză ; date relevante asupra evaluării riscului carcinogenetic la oameni ; o evaluare a datelor publicate despre produs.

Volumul este de mare interes pentru specialiștii oncologi și pentru statisticienii epidemiologi.

Ștefana Mogoș

IARC Scientific Publications No. 54 : *Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes : Some Hydrazines* (Publicațiile științifice IARC nr. 54 : „Decontaminarea în laborator și distrugerea agenților carcinogeni din deșeurile de laborator : unele hidrazine"), editat de M. Castegnaro, G. Ellen, M. Lafontaine, H. C. van Der Plas, E. B. Sansone și S. P. Tucker, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1983, 87 p.

Prezentul volum este al patrulea într-o serie editată de IARC în cadrul programului său privind elaborarea de monografii asupra unor metode de distrugere și înlăturare a deșeurilor carcinogene din laboratoarele de cercetare biomedicală. După ce primele volume au descris aspecte privind tehnici de degradare a aflatoxinelor, N-nitrozaminelor și hidrocarburilor aromatice policiclice, volumul de față abordează aceeași problematică referitoare de data aceasta la hidrazine.

Sînt luate în discuție cinci substanțe hidrazinice frecvent utilizate în perioada cercetării cancerului, și anume : hidrazina, metilhidrazina, 1,1-dimetilhidrazina, 1,2 -dimetilhidrazina și procarbazina hidroclorică, cu date privind carcinogenitatea și alte efecte biologice, adverse, evidențiindu-se principalele metode analitice de determinare a respectivelor hidrazine pe baza unei bibliografii remarcabil reprezentată.

Lucrarea trece în revistă, într-un capitol sumar, numeroasele reacții ale hidrazinelor considerate, care conduc la produși de degradare lipsiți de efecte carcinogene, apreciind totodată că doar cîtorva dintre aceste reacții li se poate da considerație practică.

În capitolul cel mai extins al volumului sînt recomandate și descrise amănunțit patru tehnici de degradare a hidrazinelor, cu eficiență practică deosebită, riguros verificată, În cazul

fiecărei metode, alături de principiu, scop, domeniu de aplicare, riscuri presupuse, sînt menționate și condițiile specifice de utilizare a procedeului pentru fiecare din compușii hidrazinici discutați.

Anca Daniela Petrescu

IAMC Scientific Publications Ho. 55 : *Laboratory Decontaminationand Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes : Some N-Nitrosamides* (Publicațiile științifice IARC nr. 55 : „Decontaminarea în laborator și distrugerea agenților carcinogeni din deșeurile de laborator : unele N-nitrozaminde''), editat de R. Castegnaro, M. Benard, L. W. van Broekhoven, D. Fine, R. Massey, E. B. Sansone, P. L. R. Smith, B. Spiegelhalder, A. Stacchini, G. Telling și J. J. Vallon, International Agency for Research on Cqncer, Lyon, 1983, 65 p.

Volumul continuă seria publicată de IARC în scopul îmbunătățirii protecției laboratoarelor de cercetare chimică, biologică sau medicală ce utilizează substanțe carcinogene ca atare sau le obțin în urma experimentărilor ca produși reziduali.

Lucrarea se referă pe larg la patru procedee de degradare pînă la produși necarcinogeni a cîtorva N-nitrozamide : N-nitrozi-N-metil-uree, N-nitrozo-N-etiluree, N-nitrozo-N-metiluretan, N-nitrozo-N-etiluretan și N-nitrozo-N'-nitro-N-metilguanidină.

Se evidențiază caracterul aplicativ pregnant al volumului, care se adresează direct laboratorului prin prezentarea în amănunte a modului de lucru necesitat de fiecare procedeu descris. Mai mult încă, spre clarificarea prezentării sînt alăturate acestor minuțioase descrieri reprezentări schematice ale procedeelor care vin să simplifice punerea în parctică acelor prezentate în lucrare.

Pentru a evita eventuala limitare a caracterului informativ al lucrării, dată de abordarea foarte la obiect a celor patru metode de neutralizare a N-nitrozamidelor carcinogene, autorii au inserat, sub formă de anexe, date fizice și chimice asupra N-nitrozamidelor considerate, precum și studii suplimentare despre degradarea N-nitrozamidelor, făcînd referiri la numeroase publicații din acest domeniu.

Autorii subliniază că tehnicile sînt concepute și testate pentru eficiență la scară mică de laborator, iar în cazul că se încearcă adaptarea lor pentru utilizări industriale se impune permanentă grijă din partea celor care le aplică astfel, de a verifica strict absența acțiunii carcinogene a produșilor de degradare ce urmează a fi înlăturați.

Anca Daniela Petrescu

ARC Scientific Publications, No. 52 ; *Second Cancer in Relation to Radiation Treatment for Cervical Cancer* (Cancerul secundar în legătură cu tratamentul prin radiații ale cancerului cervical,) sub red. N.E. Day, J. D. Boice, Jr., International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1983.

Motivația elaborării acestei cărți poate fi găsită în întrebarea : care este riscul apariției cancerului la iradieri cu doze moderate sau joase de radiații ionizate? Într-adevăr, în prezent nu există o evaluare cantitativă a acestui pericol. În prezența dozelor de radiații primite, există două categorii extreme : una a populației supuse unor doze mici, cum ar fi, de exemplu, în timpul testelor radiologice sau vizionarea programului la televizor, și o altă categorie, a indivizilor supuși la doze mari, cum sînt, de exemplu, pacienții expuși la radioterapie. Prezenta lucrare își propune studiul comparativ al acestor două categorii, luînd drept reprezentanți ai celei de-a doua categorii pacientele ce suferăde cancerul cervixului uterin. Această alegere este justificată prin faptul că în acest caz există posibilitatea măsurării cu acurateţe a dozei de radiații primite.

La baza elaborării acestei lucrări stă studiul internațional al radiațiilor asupra cancerului cervical, care, într-unul din programele sale, își propune efectuarea de cercetări individuale privind carcinogeneza datorată radiațiilor. Astfel au fost investigate 30 000 de paciente avînd diagnosticul de cancer cervical uterin care au fost tratate și urmărite din punct de vedere clinic pe o perioadă lungă de timp. Datele au fost furnizate de 15 arhive de date, provenite din 8 țări.

Cu toate că prefața cărții atrage atenția asupra caracterului descriptiv al datelor prezentate, rolul lor fiind mai degrabă de a pune întrebări în loc de a răspunde la ele, totuși capitolul recapitulativ al lucrării realizează o utilă centralizare și interpretare a informațiilor obținute. Menționăm doar una din concluziile menționate în ultimul paragraf al cărții, datorită notei sale optimiste : „riscul dezvoltării cancerului secundar la femeile tratate pentru cancer cervical — cu sau fără radioterapie — este numai cu puțin mai mare decît riscul probabil al populației în general".

S.E. Szedlacsek

IARC Scientific Publications No. 62 : *Directory of On-Going Research in Cancer Epidemiology 1984* (Ghid al cercetărilor în curs în epidemiologia cancerului), sub red. C. S. Muir, G. Wagner, Interactional Agency for Research on Cancer, Lyon, 1984

Volumul de față, continuînd seria lucrărilor analoge editate sub egida IARC, face o trecere în revistă a cercetărilor privind epidemiologia cancerului. Ghidul este rodul unei colaborări internaționale, în cadrul căreia IARC și Centrul german de cercetări oncologice (DKFZ) din Heidelberg au reprezentat nucleul de bază. De asemenea în realizarea acestui ghid a fost de un real folos interesul manifestat de Programul Băncii Internaționale de Date asupra Cercetării Cancerului al Institutului Național al Cancerului din SUA.

Ca o trăsătură generală a volumului se remarcă dezvoltarea deosebită a studiilor epidemiologice în cîteva țări, studii care devin tot mai sofisticate din punct de vedere tehnic. Se constată de asemenea o scădere a investigațiilor epidemiologice în industrie, deși urmărirea grupurilor de persoane considerate a fi expuse la un risc înalt a devenit o tehnică frecventă S-au intensificat și studiile efectuate în loaboratoarele de cercetare , care privesc în special metodele de investigare și prevenire, ca, de exemplu, posibilitatea identificării indivizilor expuși la produse chimice prin analiza lichidelor biologice. Relativ puține studii sînt realizate în legătură cu trei forme comune de cancer — de prostată, de pancreas și melanomul malign. Autorii își exprimă de altfel speranța că acest ghid va atrage atenția cercetătorilor asupra domeniilor care necesită un efort sporit.

Volumul cuprinde 1213 rezumate privind cercetările în curs asupra epidemiologiei cancerului, efectuate în 81 de țări, printre care și România, modul de structurare a cărții permițînd identificarea cu ușurință a rezumatului care tratează subiectul dorit. În acest sens, fiecare rezumat este însoțit de coduri și termeni specifici, pe baza cărora s-au întocmit lista cercetătorilor, indexul termenilor, indexul localizărilor cancerului, indexul agenților chimici, indexul tipurilor de studii, indexul ocupațiilor pacienților și indexul țărilor.

Prin vastul material documentar luat în considerare, volumul de față este un valoros ghid pentru toți cei ce se ocupă de problema epidemiologiei cancerului, reprezentînd o prețioasă sursă de informare în ceea ce privește cele mai noi cercetări în domeniu din întreaga lume

V. Ostafe

Compartments in Algal Cells and their Interaction (Compartimente în celulele algale și interacțiunea lor), sub red. W. Wiessner, D. G. Robinson, R. C. Starr, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg- New York-Tokyo, 1984, 241 p., 141 fig.

Volumul cuprinde lucrările prezentate la simpozionul al cărui nume l-a împrumutat, care a avut loc la Göttingen în 1983.

Compartimentarea celulară, considerată în interrelațiile morfologice, citofiziologice și biochimice ale organitelor care realizează compartimentarea structurală, este o modalitate optimă de studiu pentru înțelegerea funcționării edificiului complex al celulei. Materialul de studiu, din motive de ordin practic, l-au constituit celulele alegelor verzi sau albastre-verzi (cianobacterii) unicelulare, dar rezultatele și concluziile acestor studii vor putea, cel puțin parțial, să fie extrapolate la celulele organismelor pluricelulare.

Un loc central în lucrările simpozionului îl ocupă studiile asupra genomului cloroplastic, capacității sale de a codifica sinteza unor proteine care joacă un rol important în reacțiile de fixare fotosintetică a CO_2, precum și cele referitoare la cooperarea genomului cloroplastic și nuclear în biogeneza cloroplastului funcțional.

Volumul cuprinde de asemenea studii experimentale cu privire la interrelațiile dintre nucleu, citoplasmă, cloroplaste, mitocondrii și flageli, precum și dintre citoplasmă și vacuole, ca realizări de un interes deosebit ale biologiei moleculare.

Sînt prezentate datele noi cu privire la stadiul endosimbionților din grupul algelor albastre verzi (cianele), într-o concepție nouă, aceea că înglobarea endosimbionților este o modalitate majoră de compartimentare celulară, care permite, indirect, înțelegerea originii și evoluției organitelor celulare și aruncă o rază de lumină în „discontinuitatea" evolutivă procariota-eucariota.

Ca un corolar al acestui volum, studiile asupra căii de transport al electronilor în respirația și în fotosinteza cianobacteriilor, ca și în celulele de maximă specializare ale acestui grup, care sînt heterochisturile, unde are loc degradarea metabolică a glucidelor și fixarea N_2 atmosferic în NH_3, aduc ultimele noutăți în domeniul cercetării a două fenomene cu importanță energetică de ordin planetar.

Multitudinea metodelor folosite în investigarea proceselor intime ale funcționării unor organite, studiul interarelațiilor organitelor, subordonat scopului major, acela al înțelegerii funcționării celulei ca întreg, recomandă volumul tuturor celor preocupați de problemele biologiei

celulare, precum și celor interesați în cunoașterea profundă a mecanismelor intime care guvernează desfășurarea vieții la nivel subcelular și biochimic.

Lucrările simpozionului s-au bucurat de participarea, în calitate de autori, a unor specialiști recunoscuți ai problemelor de biologie și fiziologie celulară, ca E. Schnepf, H. G. Schweiger, R. Tischner, C. Kiermayer, H. Bothe etc.

Grigore Mihăescu

W. LEISTENSCHNEIDER, R. NAGEL, *Praxis der Prostatazytologie — Technik und Diagnostic* (Manual practic de citologie a prostatei — tehnică și diagnostic), Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York — Tokyo, 1984, 227 p., 325 fig. 27 tabele

Tratatul practic asupra citologiei prostatei umane cuprinde un capitol în care se descriu tehnicile biopsiei prin aspirație și tehnica frotiurilor și care cuprinde fixarea și coloratiile Papanicolau, May-Grünwald — Giemsa și hematoxilină-eozină.

După prezentarea microscopului, inclusiv tehnica microscopiei prin fluorescență, se descriu structura tip a celulei normale, atipiile celulare și se prezintă tipurile celulare existente în aspiratul de prostată. În continuare sînt descrise, la nivel citologic, carcinoamele prostatei, controlul terapiei antitumorale, sarcoamele prostatei și tumorile secundare ale prostatei.

În această carte este de asemenea descrisă citologia prostatei, tehnicile de citofotometrie și aplicarea acestor tehnici în diagnosticul carcinoamelor prostatei.

Lucrarea se încheie cu 6 pagini de bibliografie și un index de subiecte.

Toate problemele prezentate sînt bogat ilustrate cu microfotografii, colorate sau în alb-negru, bine alese și de o excepțională claritate.

Cartea este utilă citologilor din laboratoarele clinice de prevenire sau de tratament al cancerelor de prostată.

C.—C. Prunescu

Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products (Chimia și biotehnologia produselor naturale biologic active), sub red. Cs. Szántay, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1984, 368 p.

Volumul conține materialele prezentate la cea de-a 3-a Conferință internațională de la Budapesta, care a avut ca temă chimia și biotehnologia produselor naturale biologic active. Prezentate în limba engleză, cele 25 de lucrări, aportul unor nume prestigioase în domeniu, încearcă să stabilească noile posibilități ale sintezei și biosintezei în domeniul biotehnologiei, ca și în cel medical și farmaceutic.

O analiză completă a tuturor articolelor fiind imposibilă, vom prezenta cîteva lucrări mai deosebite.

W. Bertman face o prezentare a principalelor prostaglandine cu efect în activitatea cardiovasculară și descrie în detaliu metode noi de sinteză a unor analogi ai acestora cu activitatea biologică mult îmbunătățită.

J. Rokach se referă la compuși noi analizați care intervin în metabolismul acidului arahidonic în urma acțiunii lipoxigenazei. Autorul subliniază efortul pentru obținerea stereoizomerilor nenaturali, care sînt precursorii steroizomerilor leukotrienei.

O lucrare de mare importanță pentru industria medicamentelor este cea susținută de S. D. Géro, care prezintă o nouă clasă de antibiotice de tip β-lactamic. Autorul face o scurtă trecere în revistă a antibioticelor actuale, punînd în evidență caracteristicile acestora, precum și principalele direcții de dezvoltare a biosintezei unor antibiotice.

Noutăți referitoare la rolul biologic al polizaharidelor sînt aduse de lucrarea lui B. Lindberg, care se referă în special la polizaharidele din capsula pneumococitelor.

Alte două lucrări se ocupă de procesele care au loc în fermentatoare, cu referiri în special la distribuția oxigenului și transferul acestuia, stabilirea unei constante a echilibrului dinamic dintre fluxul de recirculare și procesul de aerare sau neaerare; de asemenea sînt discutate unele sisteme pentru optimizarea proceselor de fermentație.

M. Schneider și colaboratorii prezintă un nou domeniu de aplicabilitate al enzimelor, și anume acela al sintezelor asimetrice, care se bazează pe proprietățile acestora de a transforma substratele sintetice. În această lucrare, autorii separă diferiții enantiomeri dintr-un amestec racemic cu ajutorul enzimelor.

Lucrarea lui Kisfaludy despre chimia peptidelor tratează proprietățile reglatoare ale peptidelor, cu referire în special la THR (hormonul care liberează tireo-tropina). Autorii au sintetizat 40 de analogi ai acestuia, cărora le sînt studiate proprietățile structurale și cele biologice.

În legătură cu chimia terpenelor și derivații acestora, F.X. Garneau prezintă unele studii recente asupra soponinelor, compuși naturali cu o structură asemănătoare triterpenelor. Acești compuși sînt responsabili de toxicitatea întîlnită la unele nevertebrate marine. Studiile structurale au fost elaborate cu ajutorul metodelor fizice cele mai recente.

Un ultim grup de lucrări se ocupă de chimia sesquiterpenelor și a alcaloizilor, substanțe naturale prezente în plante a căror structuri și sinteze sînt elucidate în acest articol.

Datorită unor biochimiști și chimiști de prestigiu, culegerea de față aduce date noi în problema, foarte actuală, a obținerii de noi medicamente, precum și în elucidarea unor structuri ale produselor naturale biologic active.

Magdalena Lungu

Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 112 : *Retroviruses 3* (Teme curente în microbiologie și imunologie, vol. 112 : Retrovirusurile 3), sub red. P. K. Vogt și H. Koprowski, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York — Tokyo, 1984, 115 p., 19 fig.

Acest volum continuă seria lucrărilor privind retrovirusurile din volumele 103 și 107. El cuprinde rezultatele a patru echipe de cercetători.

J. Ghysdael și colaboratorii săi (Belgia) expun cercetările lor în legătură cu virusul leucemiei bovine (BLV), agent patogen ce produce o boală cronică foarte contagioasă, leucoza bovină enzootică, care evoluează într-o perioadă lungă de timp (1—8 ani). Cercetătorii și-au propus să studieze proprietățile BLV în vederea dezvoltării unor metode mult mai adecvate de control și eradicare a bolii pe care o produce.

Pe lîngă importanța practică a cercetărilor, pentru că boala este produsă la specii domestice importante de către un retrovirus răspîndit în condiții naturale, experimentele autorilor belgieni reprezintă un model interesant atît pentru studierea infecțiilor virale persistente, cît și pentru leucemiile induse de retrovirusuri la nivel celular, individual sau populațional.

S. Ruscette și L. Wolff, cercetători din SUA, au avut ca obiect al cercetărilor virusul care produce eritroleucemia rapidă la șoarecele adult, virus denumit de ei SFFV (Spleen focus — forming virus).

Clonarea moleculară a SFFV și izolarea mutanților biologici ai SFFV au permis localizarea regiunii din genomul viral implicată în patogenicitate. Această regiune include apoape exclusiv învelișul genei de SFFV, înveliș ce a constituit obiectul cercetărilor oamenilor de știință americani.

Lucrarea cercetătorului american S. P. Golf evidențiază proprietățile multiplilor mutanți virali de leucemie murină și rezumă tot ceea ce este cunoscut în legătură cu rolul fiecărui produs genic viral specific unui anumit studiu din ciclul de viață al virusului.

În final, autorul relatează pe scurt despre relațiile care există între elementele genomului viral și cel al gazdei.

Autorii ultimei lucrări a acestui volum și-au propus să evidențieze ceea ce se cunoaște pînă în prezent în legătură cu exprimarea oncogenelor celulare în țesuturile normale ale vertebratelor, în procesele normale de diferențiere și în timpul embiogenezei normale. De asemenea au fost evidențiate mecanismele prin care activarea oncogenelor celulare (C-onc) poate conduce la transformări neoplazice.

Volumul are meritul de a elucida încă o parte din problemele atît de spinoase ale etiologiei și patologiei cancerului.

Elisabeta Mihăilescu

Pharmacology of Intestinal Permeation, sub red. T.Z. Csaky, (Vol. I, II, (Farmacologia permeabilității intestinale), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg—New York — Tokyo, 1984, vol. I—708 p., vol. II—590 p.

Materialul cuprins în cele două volume prezintă unele aspecte morfologice, fiziologice, fizico-chimice, biochimice și biofizice legate de permeabilitatea intestinală.

Termenul de permeabilitate intestinală se referă la procesul de „trecere" a diferitelor substanțe din lumen în sînge sau limfă și invers. Permeabilitatea este condiția care guvernează viteza acestui proces important, care include difuzia simplă și mediată, transportul activ, pinoci-

toza fagocitoză etc. Interesul farmacologic al problemei permeabilității intestinale este determinat, pe de o parte, de faptul că acest proces determină biodisponibilitatea față de medicamente, iar pe de altă parte, de efectele farmacodinamice pe care acestea le manifestă în alterarea fiziologiei procesului de permeabilitate.

Volumul I cuprinde 17 capitole, abordînd aspectele legate de morfologia mucoasei intestinale, permeabilitatea intestinală și metodele de investigare ale acesteia. O deosebită importanță se acordă fenomenului de transport prin membrana intestinală a diferitelor substanțe de tipul electroliților, glucidelor, aminoacizilor, acizilor grași, vitaminelor, în conexiune cu aspectele energetice, fiziologice și farmacologice ale procesului.

Volumul II (14 capitole) include aspectele legate de adsorbția diferitelor medicamente și de răspunsul farmacologic al organismului la acestea, precum și rolul enzimelor digestive cuplat cu efectul hormonilor în procesul permeabilității intestinale.

În lumina acestor considerații a devenit clar că permeabilitatea intestinală nu poate fi abordată din perspectiva unei singure discipline, astfel că informațiile cuprinse în aceste volume sînt utile specialiștilor din diferite domenii, în formarea unei imagini corecte a procesului complex de permeabilitate intestinală.

Anca Roșeanu

ERICH KOLB, *Biochimie und Pathobiochemie der Fortpflanzung* (Biochimia și patobiochimia reproducerii), Gustav Fischer Verlag, Jena, 1984, 528 p,. 219 fig.

Lucrarea specialistului din R. D. Germană reprezintă o sinteză a cunoștințelor acumulate pînă în prezent într-un domeniu important al medicinii umane și veterinare, dar și al biologiei și creșterii animalelor : aparatul reproducător, cu toate consecințele care decurg din funcționalitatea normală sau/și, dimpotrivă, din disfuncția acestuia. Bazat pe o îndelungată experiență personală în sfera învățămîntului și cercetării medicale veterinare și a producției animalelor utile, tratatul autorului Kolb a fost realizat și prin consultarea unui mare număr de articole de specialitate.

Structurată în 11 capitole, lucrarea analizată este alcătuită atît din elemente de biochimie care sînt în mod evident preponderente, cît și din cele de fiziologie normală și patologică.

În primele capitole sînt prezentate cunoștințele asupra proceselor reproducerii în principalele momente ale dezvoltării în timp a acestui domeniu ; alături de noțiuni de biochimie în dezvoltarea organelor reproducătoare și de o detaliată analiză a tulburărilor aparatului reproducător și a cauzelor acestora, sînt în mod meritoriu notate și elementele hormonale care intervin în funcția reproductivă.

În continuare sînt discutate rezultatele cunoașterii din domeniul biochimiei și patobiochimiei în maturarea celulelor reproducătoare.

Elemente de biochimie și patobiochimie sînt analizate în ceea ce privește ciclul genital și, respectiv, organele reproducătoare masculine.

Biochimia fecundării, a dezvoltării blastocitului și a embrionului reprezintă capitole de sine stătătoare în tratarea materialului de către autor.

Cu analiza biochimică și patochimică a dezvoltării fetale și a nașterii, precum și prin considerarea perioadei postnatale și, mai ales, a celei postpartum, tratatul în discuție se constituie ca o lucrare cu valențe exhaustive într-un domeniu atît de complex al vieții animale.

Bogatul material bibliografic consultat, condițiile grafice calitativ deosebite contribuie, alături de înaltul nivel științiic, la realizarea unei lucrări de utilitate și de ținută remarcabile.

Alexandru Gabriel Marinescu

Springer Series in Molecular Biology : *Myxobacteria, Development and Cell Interactions* (Mixobacteriile, dezvoltare și interacțiuni celulare), sub red. E. Rosenberg, Springer-Verlag, New York-Berlin-Heidelberg-Tokyo, 1984, 300 p.

În timpul ultimilor 10 ani, studiul mixobacteriilor a cunoscut o amploare deosebită, deschizînd noi perspective în biologia moleculară și genetica bacteriană. Astfel, *Myxococcus xanthus* a devenit *Escherichia coli* a biologiei dezvoltării.

Prezentul volum reprezintă prima monografei dedicată mixobacteriilor. Fiecare din cele 11 capitole este scris de un expert în domeniul respectiv.

După un capitol introductiv, în care sînt prezentate cîteva aspecte generale asupra mixobacteriilor ca grup social de procariote, urmează cîteva capitole dedicate structurii și funcției nutriției și metabolismului mixobacteriilor, precum și modalităților de mișcare ale acestora.

Deosebit de interesante sînt studiile de genetică a mixobacteriilor şi studile asupra evoluţiei interacţiunilor sociale ale acestor procariote.

O atenţie deosebită este acordată enzimelor litice, antibioticelor şi pigmenţilor mixobacteriilor, fiind prezentate structura, biosinteza şi rolul pe care îl joacă în cadrul microorganismului.

Ultimul capitol constituie o privire de ansamblu asupra cercetării în acest domeniu în trecut, prezent şi viitor.

Volumul conţine de asemenea cinci anexe, în care sînt descrise metodele cele mai comune de studiere a mixobacteriilor.

Lucrarea se adresează în egală măsură microbiologilor şi cercetătorilor din domeniile biologiei celulare şi geneticii microbiene.

Junona Colceag

Glutamine Metabolism in Mammalian Tissues (Metabolismul glutaminei în ţesuturile mamiferelor), sub red. D. Häussinger, H. Sies, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg—New York—Tokyo, 1984, 298 p., 88 fig.

Glutamina, aminoacid al metabolismului azotului, este o formă de depozitare şi de transport atît a glutamatului, cît şi a amoniacului. Metabolismul acestui aminoacid a constituit tema celei de-a 48-a Conferinţe de chimie biologică de la Göttingen, R.F.G., din septembrie 1983, lucrările comunicate fiind incluse în volumul de faţă.

Prima parte, afectată enzimologiei glutaminei, prezintă activitatea glutaminsintetazei şi a altor glutaminoze implicate în interrelaţiile metabolismului glutaminei cu cel al glutamatului şi α-cetoglutaratului. Se continuă apoi cu rolul metabolismului glutaminei în ficat, rinichi, intestin, sistem nervos şi alte ţesuturi. În capitolul despre metabolismul glutaminei intestinului subţire se insistă asupra rolului ei ca vehicul pentru transportul azotului în ţesuturi. Se prezintă apoi rolul metabolismului glutaminei în ficat, accentuîndu-se asupra sintezei ei, heterogenităţii intracelulare, reglării sintezei glutaminsintetazei şi a pH-ului, controlului hormonal şi al proceselor ureogenezei.

Următoarele două capitole se axează pe rolul metabolismului glutaminei în rinichi, muşchi, culturi de celule, interrelaţiile glutamină—glutamat şi funcţiile lor în sistemul nervos central. Ultimul capitol tratează aspectele clinice ale rolului glutaminei în encefalopatii hepatice şi în terapia cancerului.

Lucrările prezentate în acest volum constituie o platformă utilă în dezvoltarea acestui domeniu de studiu al metabolismului intermediar.

Maria Andraş

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale de nivel științific superior din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viața științifică* în care prin note scurte sînt aduse la cunoștință cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., *Recenzii*, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată . Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : 78200 — București 2, P. O. B. 2—2.

1985 MAI 2

ÎN EDITURA ACADEMIEI A APĂRUT:

Nomenclatura biochimiei după regulile elaborate de Uniunea internaţională de biochimie şi Uniunea internaţională de chimie pură şi aplicată, sub îngrijirea şi adaptarea I. F. DUMITRU, 1984, 296 p.

Elaborată cu scopul de modernizare şi de unificare a nomenclaturii biochimice româneşti şi de integrare a ei în contextul internaţional, lucrarea se înscrie în seria volumelor consacrate adaptării la limba română a nomenclaturii biochimice internaţionale.

Sînt consemnate reguli şi recomandări de nomenclatură referitoare la principalele domenii ale biochimiei, reguli ce înlesnesc comunicarea orală şi scrisă între biochimiştii din cele mai diferite laboratoare, facilitează circulaţia rapidă a rezultatelor cercetătorilor, constituie un instrument preţios în educarea ştiinţifică biochimică a viitorilor specialişti şi permit accesul la realizările ştiinţifice şi tehnice ale contemporanilor noştri.

Se adresează în egală măsură cercetătorilor în domeniile biochimiei, biologiei, medicinii, farmaciei, chimiei organice şi chimiei compuşilor naturali, cadrelor didactice de specialitate, studenţilor de la facultăţile de profil, specialiştilor care se ocupă cu brevetarea invenţiilor etc.

RM – ISSN 0049 – 2396

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 28, NR. 1, P. 1–100, BUCUREŞTI
IANUARIE – IUNIE 1985

c. 1041 I. P. Informaţia

43 816

Lei 30

F1330
04
64

studii şi cercetări de biochimie

L:040405

2

TOMUL 28

1985

IULIE — DECEMBRIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 28, nr. 2, p. 101—192, 1985, Bucureşti

SCBIAS 28 (2), 1985

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de două ori pe an. În țară, abonamentele se primesc la oficiile poștale. Cititorii din străinătate se pot abona prin ROMPRESFILATELIA, sectorul export-import presă, P.O. Box 12—201, telex 10 376, prsfi r, 78104 — București, R. S. România, Calea Griviței nr. 64—66.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie", București, P.O. Box 2—2, 78200 — București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 79717

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

TOMUL 28, NR. 2 1985

IULIE—DECEMBRIE

SUMAR

IN MEMORIAM: academicianul EUGEN MACOVSCHI (1906—1985) 103

EUGENIU NICULESCU-MIZIL, Materia biostructurală, de la ipoteză la certitudine ştiinţifică 115

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, Efectele plumbului şi arsenului asupra activităţii piruvatdehidrogenazei din creierul de şobolan 125

I. I. BĂRA, ELVIRA GILLE, T. POPESCU, A. MIHALEA, Caracteristici ale mutantei albe de *Cynara scolymus* L. I. Dinamica polifenolilor şi flavonelor 130

LIGIA MATEI, Procedeu simplificat de preparare a lizozimului din albuş de ou 133

G. NEAMŢU, I. CĂBULEA, AUGUSTA LUJERDEAN, FL. IRIMIE, Cercetări biochimice asupra carotenoidelor din porumb. IV. Modificarea conţinutului carotenoidelor şi al unor elemente minerale (N, K, P, Na, Ca, Mg) din boabele unor hibrizi de porumb diploid şi opaque-2, în timpul păstrării acestora 141

RADU OLINESCU, DIDINA COJOCEA, ELEONORA PASCU, STELA GIORGIONE, Variaţia eliminării urinare a acidului 5-hidroxi-indolacetic în iradieri terapeutice 147

V. TĂMAŞ, V. POPESCU, Pigmenţi carotenoidici din cîteva soiuri şi populaţii de *Lolium perenne* 152

ELVIRA TĂNASE, VLAD ARTENIE, G. LUPAŞCU, Activitatea unor enzime hidrolitice la plantele de cultură tratate cu metilclor 155

REFERATE GENERALE

JUNONA COLCEAG, Funcţii biologice ale lectinelor în organisme animale 159

DAN MIHĂILESCU, ROMEO POPA, Rezonanţa electronică de spin (RES) în studiul membranelor 172

RECENZII 186

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

TOME 28, No. 2 1985

JULY—DECEMBER

CONTENTS

IN MEMORIAM: EUGEN MACOVSCHI member of the Academy (1906—1985) . . . 103

EUGENIU NICULESCU-MIZIL, The biostructural matter, from hypothesis to scientific ascertainment 115

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, Lead and arsenic effects on pyruvate-dehydrogenase activity in rats brain 125

I. I. BĂRA, ELVIRA GILLE, T. POPESCU, A. MIHALEA, The features of white *Cynara scolymus* L. mutant. I. The dynamics of polyphenols and flavones 130

LIGIA MATEI, Simplified procedure for hen egg-white lysozyme preparation 133

G. NEAMŢU, I. CĂBULEA, AUGUSTA LUJERDEAN, FL. IRIMIE, Biochemical investigations of carotenoids in maize. IV. Alteration of carotenoid- and some mineral element contents (N, K, P, Na, Ca, Mg) in grains of certain hybrids of diploid and opaque-2 maize during storage 141

RADU OLINESCU, DIDINA COJOCEA, ELEONORA PASCU, STELA GIORGIONE, The variations of the 5-hydroxy indoleacetic acid elimination in urine following therapeutical irradiations 147

V. TĂMAŞ V. POPESCU, Carotenoid pigments in some varieties and population of *Lolium perenne* 152

ELVIRA TĂNASE, VLAD ARTENIE, G. LUPAŞCU, The activity of some hydrolytic enzymes in the cultured plants treated with methylchlorine 155

GENERAL REVIEWS

JUNONA COLCEAG, Biological functions of animal lectins 159

DAN MIHĂILESCU, ROMEO POPA, Electron spin resonance applications in membrane research 172

REVIEWS 186

academicianul EUGEN MACOVSCHI

(1906–1985)

În seara zilei de 3 aprilie 1985, biochimia românească a suferit o deosebit de grea pierdere prin săvîrșirea fulgerătoare din viață a celui mai valoros reprezentant al ei, academicianul Eugen Macovschi. Revista noastră și-a pierdut totodată redactorul responsabil.

Născut la 4 februarie 1906 la Chișinău, a urmat școala elementară și liceul în orașul natal, iar studiile superioare și le-a făcut la Facultatea de științe a Universității din Cluj, luîndu-și licența în chimie în anul 1928. Urmare a calităților sale deosebite de cercetător, trei ani mai tîrziu, în 1931, își dă doctoratul cu o teză de chimie organică, „Reacții fotochimice în seria orto-nitro-benzilidenpoliolilor," obținînd calificativul „Magna cum laudae".

Înzestrat cu o mare sete de cunoaștere, și-a extins, încă de pe băncile facultății, pregătirea științifică prin frecventarea în paralel a unor cursuri, efectuarea de lucrări practice și susținerea de examene din programul secției de științe naturale a aceleiași facultăți.

Umanist de mare sensibilitate sufletească, cu deosebite înclinații artistice și preocupări polivalente, Eugen Macovschi a manifestat încă din copilărie aptitudini pentru muzică, urmînd, pe lîngă cursurile liceale, și pe cele ale secției de pian a Școlii de muzică, iar în timpul studiilor universitare la Cluj a urmat și absolvit și cursurile secției de pian a Conservatorului de muzică și artă dramatică „Gh. Dima". Dragostea pentru muzică

l-a însoţit toată viaţa; dovadă, în 1949, susţinea la Academie o comunicare despre F. Chopin.

Ca student cu multiple preocupări, a avut ca profesori pe unii dintre marii savanţi şi oameni de cultură români, printre care Gheorghe Spacu, Ioan Tănăsescu, Dan Rădulescu, Emil Racoviţă, Alexandru Borza, Emil Pop, Marţian Negrea, Ion Bobescu.

Calităţile sale deosebite l-au îndreptăţit să obţină prin concurs o bursă a guvernului francez, elaborînd lucrări de specializare în biochimie (la prof. Gabriel Bertrand), în fiziologia sistemului neuro-muscular (la prof. Louis Lapicque) şi în toxicologie (la prof. Emil Kohn — Abrest) în perioada 1933—1934 la Paris.

A început încă de cînd era student să desfăşoare la Facultatea de ştiinţe a Universităţii din Cluj o activitate didactică, ca preparator şi apoi ca asistent, pentru ca la puţin timp după obţinerea titlului de doctor în chimie, în anul 1934, să devină conferenţiar de chimie organică la Institutul politehnic din Timişoara, iar în anul 1940 să ocupe, ca profesor titular, catedra de chimie biologică a Facultăţii de ştiinţe a Universităţii din Bucureşti (devenită ulterior Facultatea de biologie), funcţie pe care a deţinut-o fără întrerupere pînă în anul 1974, cînd, după pensionare, a rămas să activeze în continuare ca profesor consultant pînă la sfîrşitul neaşteptat al zilelor sale, care l-a surprins încă în plină muncă de creaţie ştiinţifică.

Această muncă a desfăşurat-o dealtminteri nu numai la catedră, ci şi, mai ales, ca director al Institutului de biochimie al Academiei R. S. România, pe care l-a condus timp de peste două decenii (1948—1972). Ea a fost larg recunoscută, atît în ţară cît şi în străinătate, prin alegerea sa ca membru titular al Academiei de ştiinţe din România (1942), al Academiei de medicină din România (1945), al Academiei Române (1948), din Prezidiul căreia a făcut parte şi în cadrul căreia a condus, ca preşedinte, Secţia de ştiinţe geologice, geografice şi biologice, Comisia de biochimie, al cărei fondator a şi fost, precum şi prin conferirea titlului de membru al mai multor prestigioase organizaţii ştiinţifice internaţionale, dintre care unele au ţinut să-l coopteze în conducerea lor, ca vicepreşedinte sau ca membru al prezidiului lor (International Society for Research of Civilisation Diseases and Vital Substances, International Society for the Study of the Origine of Life ş.a.).

În semn de recunoaştere a activităţii sale ştiinţifice, i s-a acordat titlul de doctor docent în ştiinţe (1967), şi i s-au conferit ordine şi medalii, la care s-au adăugat şi decoraţii decernate în străinătate (Franţa, U.R.S.S.). Rămîne un mare profesor şi un mare savant, munca sa ştiinţifică materializîndu-se şi prin formarea, în calitate de conducător ştiinţific, a peste şaizeci de doctori în chimie şi biologie.

Începută din 1929 cu lucrări de chimie organică, activitatea de cercetare a academicianului Eugen Macovschi a abordat, încă din 1936, problema permeabilităţii membranelor vii, apoi a celor artificiale, iar din 1958 a fost polarizată pe elaborarea unei noi concepţii, originale, privitoare la structura materiei vii, anume teoria biostructurală, teorie care, prin interesul pe care l-a trezit în lumea ştiinţifică din ţară şi străinătate, ca şi prin noile perspective pe care le deschide în cercetarea fenomenelor vieţii, se dovedeşte a fi deosebit de fertilă şi reprezintă, fără îndoială, opera lui de căpetenie, contribuţia sa fundamentală la progresul ştiinţelor biologice.

În cele ce urmează vor fi trecute în revistă, pe scurt, numai cîteva din principalele contribuții ale academicianului Eugen Macovschi în direcțiile de cercetare științifică amintite.

Dintre cercetările sale în domeniul chimiei organice, amintim, cu deosebire, descoperirea transformării neașteptate a funcției cian în amidă și a acesteia în carboxil în decursul sintezei unor stilbeni și butadiene, reacție care s-a dovedit apoi a avea un caracter general și a nu fi o simplă hidroliză parțială a funcțiilor respective. Mai menționăm elucidarea unor mecanisme de reacție privind sinteza trifenilpiperidonei, a azoxiderivaților aromatici și a unor aminostilbeni, cercetări care au făcut dovada că mecanismele propuse anterior de alți cercetători sînt eronate. Se mai pot cita numeroasele sinteze de substanțe curarizante și de alți compuși organici.

Lucrările consacrate studiului permeabilității membranelor au avut ca principal obiectiv descoperirea unor posibilități de investigare a mecanismului trecerii substanțelor toxice prin membranele vii. Rezultatele obținute au arătat că permeabilitatea membranelor este un proces de difuzie pasivă ce se desfășoară potrivit unor „ecuații de otrăvire", pe care autorul le-a putut deduce din legea de difuzie a lui Fick și care concordă întocmai cu observațiile a numeroși alți cercetători ce s-au preocupat de comportarea în soluții toxice a unor animale acvatice. Totodată, academicianul Eugen Macovschi a elaborat un model experimental fizico-chimic al aparatului branhial viu al peștilor, model pe care autorul l-a numit „branhie artificială" și care i-a permis să verifice „in vitro" valabilitatea ecuațiilor de otrăvire și, implicit, ideea că permeabilitatea membranelor vii, ca și cea a membranelor artificiale (celofan etc.), este un fenomen de difuzie ce se conformă legii lui Fick. Trebuie subliniat că ecuațiile de otrăvire, elaborate cu mai multe zeci de ani în urmă, prezintă, incontestabil, un interes sporit în ultima vreme, cînd poluarea mediului nostru de viață ridică probleme de o stringentă actualitate.

Ca director al Institutului de biochimie, Eugen Macovschi a inițiat și a dezvoltat, pornind de la preocupările sale anterioare, cercetări atît în domeniul biochimiei animalelor cît și în cel al biochimici vegetale.

Aprofundarea investigațiilor în problema biochimiei și a excitabilității sistemului neuro-muscular a impus cunoașterea tot mai completă a proteinelor musculare și cerebrale, a enzimelor și a reacțiilor enzimatice care se produc în mușchi și în creier, a rolului substanțelor macroergice și a ionilor cuprinși în mușchi, a reglării proceselor enzimatice, mai ales a glicolizei etc. Extinderea cercetărilor pe diferite animale a condus la diferențierea treptată a două domenii de cercetare : biochimia musculară și biochimia comparată. Nevoia de caracterizare și de identificare mai exactă a proteinelor a dus la apariția celui de-al treilea domeniu de cercetare, imunochimia. Biochimia vegetală și biochimia acizilor nucleici au fost alte două domenii care au evoluat sub directa conducere a directorului institutului.

În cadrul institutului s-au realizat și lucrările care au făcut trecerea spre studiul fenomenului vieții, și anume în domeniul coacervatelor și al reacțiilor enzimatice în medii macroeterogene, precum și cele prin care s-au elaborat noi metode biochimice și fizico-chimice destinate laboratorului clinic, noi metode de investigare a biochimismului vegetal și a exosmozei electroliților din țesuturile vii etc.

În aceste direcții de cercetare, dezvoltate în institut sub îndrumarea directă a academicianului Macovschi, s-au publicat pe parcursul a peste două decenii, un număr de 530 de lucrări științifice. Deși toate poartă amprenta concepției științifice a directorului, numai 90 dintre ele au și semnătura sa ca autor sau coautor. Acest fapt denotă pregnant modestia, generozitatea sa, atitudinea părintească față de cadrele de cercetare tinere, grija sa permanentă de a le ajuta să obțină rezultate științifice proprii valoroase, prin care să se poată afirma.

Dar toate cercetările efectuate în aceste domenii convergeau spre un singur țel, acela al aprofundării cunoașterii naturii și a structurii materiei vii, încununate prin elaborarea concepției biostructurale, care constituie opera de o viață a profesorului Macovschi și care a revoluționat gîndirea științifică, postulînd că materia vie este constituită din două forme ale materiei, și anume din combinații chimice aflate într-o stare biostructurală specifică viului (materia biostructurală) și din combinații chimice aflate în stare moleculară (materia moleculară coexistentă). În materia vie se produc astfel trei feluri de transformări: biostructurale, metabolice și chimice.

Prin concepția sa biostructurală, academicianul Eugen Macovschi a deschis larg calea conturării unor idei și cercetări noi în cele mai diferite domenii ale biologiei, ca: permeabilitatea membranelor, starea apei și a altor numeroase componente în țesuturile organismelor vii, relațiile dintre noxe, organism și medicamente, originea vieții pe planeta noastră, originea undelor electroencefalografice, definirea substratului material al gîndirii abstracte și al fenomenelor psihotronice, pluralitatea nivelurilor structurale ale materiei vii în univers. Aceeași concepție a deschis perspective noi și în domeniul cancerogenezei, în farmacologie, în ecologie și a contribuit la dezvoltarea altor domenii științifice cum sînt cele legate de teoria cîmpurilor (prin teoretizări despre cîmpurile bionice și cele noesice), de analiza materiei vii ca sistem cibernetic ierarhizat ș.a.

Academicianul Eugen Macovschi a depus o stăruitoare și neobosită activitate de fundamentare experimentală și de răspîndire în cercuri cît mai largi — științifice și profane — a noilor sale vederi, prin comunicări prezentate în cadrul unor numeroase congrese și simpozioane, naționale și internaționale, ca și printr-un număr impresionant (peste 150) de publicații de specialitate, românești și străine, prin teze de doctorat sau prin articole de popularizare. Ultima sa lucrare a apărut postum, iar în cea din urmă zi a vieții a dat forma finală unei noi comunicări pe care o pregătea pentru o manifestare științifică din străinătate.

A plecat dintre noi cu totul pe neașteptate, dar lasă în urma sa o operă vastă, bogată și totodată fertilă prin deschiderea a noi și noi căi de cercetare ce se desprind din ea.

Comitetul de redacție.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN REVISTE DE SPECIALITATE DE ACADEMICIANUL EUGEN MACOVSCHI

1. *Réactions photochimiques dans la série des dérivés o-nitrobenzylidène-acétals. O-nitro-benzylidène-1,2-glycérine*, în colaborare cu I. Tănăsescu, Bull. Soc. Chim. France, **45**, 1022—1030 (1929).
2. *Réactions photochimiques dans la série des dérivés o-nitro-benzylidène-acétals.* Note IV. *Tri-o-nitro-benzylidène-mannite*, în colaborare cu I. Tănăsescu, Bull. Soc. Chim. France, **47**, 86—93 (1930).

3. *Réactions photochimiques dans la série des dérivés o-nitro-benzylidène acétals.* Note V. *Tri-o-nitro-benzylidène-sorbite*, în colaborare cu I. Tănăsescu, Bull. Soc. Chim. France, **47**, 457—462 (1930).
4. *Vitamina D*, Revista ştiinţifică „V. Adamachi", **16**, 78 (1930).
5. *La transformation de l'ergostérine dans le facteur antirachitique*, Bull. Soc. Chim. Roum., **12**, 183 (1930).
6. *Sur le mécanisme de dégradation hydrolytique des sucres*, Bull. Soc. Chim. France, **51**, 1306—1309 (1932).
7. *Réactions photochimiques dans la série des dérivés o-nitro-benzylidène-acétals.* Note VI. *Sur la constitution des substances résultant de l'isomérisation photochimique des o-nitro-benzylidène-acétals*, în colaborare cu I. Tănăsescu, Bull. Soc. Chim. France, **51**, 1371—1377 (1932).
8. *Réactions photochimiques dans la série aes dérivés o-nitrobenzylidène-acétals.* Note VII. *O-nitro-1,2-benzylidène-glycérins*, în colaborare cu I. Tănăsescu, Bull. Soc. Chim. France, **51**, 1556—1565 (1932).
9. *Synthesen in der Homoneurinreihe*, în colaborare cu E. Ramonţianu, Journ. f. prakt. Chemie, **135**, 137—141 (1932).
10. *Synthesen in der Homoneurinreihe.* II. Mitteilung. *Homoneurine der Chinaalkaloide*, în colaborare cu Al. Silberg, Journ. f. prakt. Chemie, **135**, 237—244 (1932).
11. *Sur la nature du sucre sanguin*, în colaborare cu I. Nitzescu, Journ. Physiol et Pathol. générale, **30**, 873—879 (1932).
12. *Réactions photochimiques dans la série des dérivés o-nitro-benzylidène-acétals.* Note VIII. *Di-o-nitro-benzylidène-dulcite*, în colaborare cu I. Tănăsescu, Bull. Sec. Chim. France, **53**, 1097—1102 (1933).
13. *Le problème du sucre sanguin*, Archivio di Sciente Biologiche, **19**, 28—37 (1933).
14. *Mechanismus der Ch. Mayerschen Triphenylpiperidonsynthese*, în colaborare cu Al. Silberg, Journ. f. prakt. Chemie, **137**, 131—140 (1933).
15. *Heterocyclische Acetylcholine*, în colaborare cu E. Ramonţianu, Journ. f. prakt. Chemie, **138**, 92—98 (1933).
16. *Synthesen in der Homoneurinreihe.* III. Mitteilung. *Homoneurine der Chinaalkaloide als qualitative Reagenzien für Jodionen*, în colaborare cu Al. Silberg, E. Ramonţianu şi El. Crăciunescu, Journ. f. prakt. Chemie, **139**, 255—260 (1934).
17. *Synthesen in der Homoneurinreihe.* IV. Mitteilung. *Bromderivate des Pyridinhomoneurins*, în colaborare cu E. Ramonţianu, Bul. Soc. Ştiinţe Cluj, **8**, 272—278 (1935).
18. *Bromdérivés de quinoléinehomoneurine*, în colaborare cu C. Cândea şi J. Kuhn, Atti del V Congresso Nationale di Chimica Pura ed Applicata, Sardegna, 331—336 (1935).
19. *Nitro-dérivés du fluorène. Sur le nitro-2-fluorène*, în colaborare cu C. Cândea, Bull. Soc. Chim. France, **2**, 1703—1709 (1935).
20. *Quelques sels organiques d'ammonium contenant le radical cétyle*, Bull. Soc. Chim. France, **3**, 498—500 (1936).
21. *Synthèses dans la série des homoneurines. Bromdérivés de l'isoquinoléinhomoneurine*, în colaborare cu C. Cândea, Bull. Soc. Chim. France, **3**, 1309—1318 (1936).
22. *Nitro-dérivés du fluorène.*Note II. *Sur une réaction colorée donnée par quelques dérivés du nitro-2-fluorène*, în colaborare cu C. Cândea, Bull. Soc. Chim. France, **3**. 1761—1767 (1936).
23. *Einfluss der hohen Temperaturen auf Krackgase erhalten durch thermische Spaltung von rumänischen Petroleum (Moreni)*, în colaborare cu C. Cândea, Bull. Scient. Ecole Polytechnique de Timişoara, **6**, 305—316 (1936).
24. *L'action des chlorures de cétylpyridinium et cétylquinoleinium sur les poissons de mer*, în colaborare cu Eufr. Macovschi, Archivio di Scienze Biologiche, **22**, 437—456 (1936).
25. *Rolul peştilor mici în toxicologie*, Clujul medical, 421 (1936).
26. *Une réaction colorée pour les amines aromatiques*, în colaborare cu C. Cândea, Bull.Soc. Chim. France, **4**, 1398—1401 (1937).
27. *Über die Bestimmung aromatischer Kohlenwasserstoffe in rumänischen Naturbenzonen*, în colaborare cu C. Cândea, Bull. Scient. Ecole Polytechnique de Timişoara, **7**, 301—310 (1937).
28. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. I. Permeabilität des Kiemenepitheliums von Atherina hepsetus L. für Cetylchinoleiniumchlorid*, în colaborare cu Eufr.-Macovschi, Archiv exp. Pathol. Pharmakol., **185**, 309—324 (1937).
29. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen. II. Die Permeabilität der Zellenmembran von Paramecium caudatum für einige Substanzen*, în colaborare cu Eufr. Macovschi, Archiv exp. Pathol. Pharmakol., **185**, 566—571 (1937).
30. *Utilizarea peştilor ca animale de experienţe în toxicologie*, Arhivele Inst. de medicină legală, Cluj, **1**, 153—162 (1937).
31. *Sur le méthyl-2-nitro-5-benzonitrile*, în colaborare cu C. Cândea, Bull. Soc. Chim. France, **5**, 1350—1357 (1938).
32. *Quelques bases Schiff dérivées du méthyl-2-amino-5-benzo-nitrile*, în colaborare cu C. Cândea, Bull. Soc. Chim. France, **4**, 1487—1489 (1938).

33. *La condensation de la benzalacétone avec l'acide hippurique*, în colaborare cu C. Cândea, C. R. Acad. Sciences de Roumanie, **2**, 257—258 (1938).
34. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen.* III. *Die Permeabilität der Zellen des Kiemenepitheliums von Atherina hepsetus L. für Saponin*, în colaborare cu Eufr. Macovschi, Archiv. exp. Pathol. Pharmakol., **188**, 405—417 (1938).
35. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen.* IV. *Permeabilität des Kiemenepitheliums von Gasterosteus für Telepatin*, în colaborare cu Eufr. Macovschi, Archiv exp. Pathol. Pharmakol., **189**, 45—52 (1938).
36. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen.* V. *Permeabilität des Kiemenepitheliums von Gasterosteus aculeatus für einige organische Sauren*, în colaborare cu Eufr. Macovschi, Archiv. exp. Pathol. Pharmakol., **189**, 140—150 (1938).
37. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen.* VI. *Permeabilität des Kiemenepitheliums von Atherina hepsetus L. für Strychnin*, în colaborare cu Eufr. Macovski, Archiv exp. Pathol. Pharmakol., **189**, 281—287 (1938).
38. *Sur la condensation du méthyl-2-nitro-benzonitrile avec les aldéhydes aromatiques*, în colaborare cu C. Cândea, Bull. Soc. Chim. France, **6**, 1182—1187 (1939).
39. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen.* VII. *Wirkung der Adsorptionserscheinungen auf die Penetration des Cetylchinoleiniumchlorids durch das Kiemenepithelium von Atherina hepsetus L.*, în colaborare cu Eufr. Macovschi, Archiv exp. Pathol. Pharmakol., **191**, 628—648 (1939).
40. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen.* VIII. *Wirkung der Adsorptionserscheinungen auf die Penetration des Saponins in die Zellen des Kiemenepitheliums von Atherina hepsetus L.*, în colaborare cu Eufr. Macovschi, Archiv exp. Pathol. Pharmakol., **192**, 321—330 (1939).
41. *Die Umwandlung einiger ortho-standiger Funktionen bei der Stilbensynthese*, în colaborare cu J. Georgescu și C. Bachmeyer, Bert. dtsch. chem. Ges., **74**, 1279—1284 (1941).
42. *Die Reaktion von Benzanilin bzw. Cinnamalanilin mit Aceton im Gegenwart von Wasserstoffperoxyd*, în colaborare cu S. Pop și A. Lepădatu, Ber. dtsch. chem. Ges., **74**, 1724—1728 (1941).
43. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen.* IX. *Die Berechnung der Vergiftungskonstanten nach der Methode der kleinsten Quadrate*, Biochem. Ztschr., **310**, 313—324 (1942).
44. *Kunstliche Kieme als Hilfsmittel zur Untersuchung der Permeabilität lebender Membranen.* I. Mitteilung. *Prüfung einiger Vergiftungsgleichungen an der Oxalsaurepenetration durch die Cellophanmembran*, în colaborare cu G. Stan, Biochem. Ztschr., **310**, 255—280 (1942).
45. *Kunstliche Kieme als Hilfsmittel zur Untersuchung der Permeabilität lebender Membranen.* II. Mitteilung. *Prüfung der Vergiftungsgleichung* $c\,(t - t_0) = k$ *an der Oxalsaurepenetration durch die Cellophanmembran*, în colaborare cu G. Stan, Biochem. Ztschr., **312**, 213—226 (1942).
46. *Kunstliche Kieme als Hilfsmittel zur Untersuchung der Permeabilität lebender Membranen.* III. Mitteilung. *Prüfung einiger Vergiftungsgleichungen an der Kaliumchloridpenetration durch die Cellophanmembran*, în colaborare cu G. Stan, Biochem. Ztschr., **313**, 337—351 (1942)
47. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen.* X. *Prüfung der Vergiftungsgleichung* $(c - c_0)(t - t_0 - m) = K$ *an der Saponinpenetration in das Kiemenepithelium von Alburnus lucidus Heck*, în colaborare cu A. Stancu, Biochem. Ztschr., **313**, 250—264 (1942).
48. *Die Kondensation von 3-nitro-4-methyl-benzonitril und 3-nitro-4-methyl-benzamid mit Benzaldehyd*, în colaborare cu J. Georgescu, Ber. dtsch. chem. Ges., **76**, 358—365 (1943).
49. *Kunstliche Kieme als Hilfsmittel zur Untersuchung der Permeabilität lebender Membranen.* IV. Mitteilung. *Die Penetration von Amylalkohol durch eine Cellophanmembran*, în colaborare cu V. Zinca, Biochem. Ztschr., **314**, 373—388 (1943).
50. *Quelques synthèses dans la série des stilbènes*, în colaborare cu C. Bachmeyer, C. R. Acad. Sciences de Roumanie, **7**, 79—81 (1943).
51. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen.* XI. *Die Giftwirkung von Seewasser verschiedener Konzentration auf Gammarus pulex und einige Vergiftungsgleichungen*, în colaborare cu Eufr. Macovschi, Biochem. Ztschr., **315**, 320—328 1943).
52. *Untersuchungen über die Permeabilität lebender Membranen.* XII. *Das Eindringen von Strychnin aus einer infizierten Lösung in fen Froschkörper (Rana ridibunda Pall.) und die entsprechende Vergiftungsgleichung*, în colaborare cu Z. Opreanu, Biochem. Ztschr., **316**, 359—371 (1944).
53. *La condensation du méthyl-3-nitro-6-benzonitrile et de la méthyl-3-nitro-6-benzamide avec la benzaldéhyde*, în colaborare cu J. Georgescu, Bull. Scient. Académie Roumaine, **28**, 354-362 (1946).
54. *Die Umwandlung einiger ortho-standiger Funktionen bei der Stilbensynthese.* II. Mitteilung, în colaborare cu C. Bachmeyer, Bull. Scient. Académie Roumaine, **28**, 413—425 (1946).

55. *Uber die Benzyliden-N-piperidyl-benzamide*, în colaborare cu C. Bachmeyer, Bull. Scient. Académie Roumaine, **28**, 542—554 (1946).
56. *Quelques considérations stéréochimiques sur l'activité physiologique de substances oestrogènes*, în colaborare cu J. Georgescu, Bull. Scient. Académie Roumaine, **28**, 645—667 (1946).
57. *La substitution de l'acide tricloracétique et du sulfate de potassium dans la méthode Kowarsky par le ferricyanure de potassium et par le tetrachlorure de carbon*, în colaborare cu Z. Opreanu, Bull. Scient. Académie Roumaine, **29**, 15—20 (1946); Bull. Académie de Médecine de Roumanie, **18**, 83—85 (1946).
58. *Recherches sur la perméabilite des membranes vivantes.* XIII. *La toxicité de l'eau de mer de différentes concentrations pour Daphnia magna*, Bull. Scient. Académie Roumaine, **29**, 86—90 (1946).
59. *La transformation de certaines fonctions organiques situées en ortho pendant la synthèse des stilbènes.* Note III. *Le mécanisme de la transformation : une nouvelle transposition intramoléculaire*, în colaborare cu J. Georgescu, Bull. scient. Académie Roumaine, **29**, 139—147 (1946).
60. *Kunstliche Kieme als Hilfsmittel zur Untersuchung der Permeabilität lebender Membranen.* V. Mitteilung. *Die Penetration von Butylalkohol durch eine Cellophanmembran*, în colaborare cu V. Zinca, Bull. Scient. Académie Roumaine, **29**, 235—243 (1946).
61. *La branchie artificielle utilisée comme moyen aidant à la recherche de la perméabilité des membranes vivantes.* Note VI. *La pénétration du violet de méthyle à travers une membrane de cellophane*, în colaborare cu A. Jivănescu, Bull. Scient. Académie Roumaine, **29**, 280—302 (1947).
62. *La branchie artificielle utilisée comme moyen aidant à la recherche de la perméabilité des membranes vivantes.* Note VII. *La pénétration de la fuxine à travers une membrane de cellophane*, în colaborare cu A. Jivănescu, Bull. Scient. Académie Roumaine, **29**, 339—347 (1947).
63. *Lichtelektrische Mikrobestimmung von Quecksolberchlorid mittels Hydroxylamin*, în colaborare cu A. Stancu-Ştefan, Bull. Scient. Académie Roumaine, **29**, 437—441 (1947).
64. *La transformation des certaines fonctions organiques situées en ortho pendant la synthèse des stilbènes.* Note IV. *La condensation du méthyl-2-nitro-5-benzonitrile avec p-diméthyl-aminobenzaldèhyde*, în colaborare cu C. Oancea, Bull. Scient. Académie Roumaine, **29**, 500—505 (1947).
65. *Ein neuer Apparat für Gasanalytische Mikrobestimmungen (Ein neues Mikroureometer)*, Bull. Scient. Académie Roumaine, **29**, 555—558 (1947).
66. *La branchie artificielle utilisée comme moyen aidant à la recherche de la perméabilité des membranes vivantes.* Note VIII. *La pénétration du vert malachite à travers une membrane de cellophane*, în colaborare cu A. Jivănescu, Bull. Scient. Académie Roumaine, **29**, 647—653 (1947).
67. *La branchie artificielle utilisée comme moyen aidant à la recherche de la perméabilité des membranes vivantes.* Note IX. *La pénétration de l'alcool amylyque à travers une membrane de l'intestin*, în colaborare cu V. Zinca, Bull. Scient. Académie Roumaine, **30**, 106—119 (1947).
68. *Recherches sur la perméabilité des membranes vivantes.* Note XIV. *Action toxique du chlorure mercurique sur Daphnia magna*, în colaborare cu A. Stancu-Ştefan, Bull. Scient. Académie Roumaine, **30**, 139—150 (1947).
69. *La transformation de la fonction cyane située en ortho pendant la synthèse des diphényl-butadiènes*, în colaborare cu C. Rabega, Bull. Scient. Académie Roumaine, **30**, 291—297 (1947).
70. *La branchie artificielle utilisée comme moyen aidant à la recherche de la perméabilité des membranes vivantes.* Note X. *Le pénétration du violet de méthyle à travers une membrane de l'intestin*, în colaborare cu A. Jivănescu, Bull. Scient. Académie Roumaine, **30**, 331—337 (1948).
71. *Recherches sur la perméabilité des membranes vivantes.* Note XV. *Action toxique du chlorure mercurique sur Perca fluviatilis*, în colaborare cu A. Stancu-Ştefan, Bull. Scient. Académie Roumaine, **30**, 338—343 (1948).
72. *La branchie artificielle utilisée comme moyen aidant à la recherche de la perméabilité des membranes vivantes.* Note XI. *La pénétration du chlorure mercurique à travers une membrane de cellophane*, în colaborare cu A. Stancu-Ştefan, Bull. Scient. Académie Roumaine, **30**, 396—401 (1948).
73. *Recherches sur la perméabilité des membranes liquides.* Note I. *Un dispositif photoélectrique pour les recherches sur la perméabilité des membranes liquides*, Bull. Scient. Académie Roumaine, **30**, 465—468 (1948).
74. *Cercetarea permeabilităţii membranelor cu ajutorul branchiei artificiale*, în colaborare cu A. Jivănescu, Bul. Ştiinţ. Academia R.P.R., Seria A, **1**, 71 (1948).
75. *Cercetări asupra permeabilităţii membranelor lichide*, în colaborare cu M. Mikietiuk, Bul. Ştiinţ. Academia R.P.R., Seria A, **1**, 171 (1949).
76. *Reducerea unor m-nitroamide aromatice cu ajutorul pulberei de zinc*, în colaborare cu Tr. Rădulescu, Bul. Ştiinţ. Academia R.P.R., Seria A, **1**, 253 (1949).

77. *Cercetarea permeabilității membranelor cu ajutorul branchiei artificiale.* Nota XIII. *Pătrunderea verdelui malachit prin membrane de intestin*, în colaborare cu A. Jivănescu, Bul. Științ. Academia R.P.R., Seria A, **1**, 399 (1949).
78. *Mecanismul formării azoxiderivaților din nitroderivați sub acțiunea cetonelor aromatice*, în colaborare cu A. Petrescu, Bul. Științ. Academia R.P.R., Seria A, **1**, 485 (1949).
79. *Căutarea metodelor noi de diagnostic biochimic.* Nota I. *Precipitarea proteinelor din serul sanguin uman normal și canceros, prin acidul sulfosalicilic ce difuzează din alcool amilic în ser*, în colaborare cu X. Mămăligă, Bul. Științ. Academia R.P.R., Seria A, **1**, 501 (1949).
80. *Căutarea metodelor noi de diagnostic biochimic.* Nota II. *Difuzia verdelui acid din alcool amilic în serul sanguin uman normal și patologic*, în colaborare cu C. Demetrescu, Bul. Științ. Academia R.P.R., Seria A, **1**, 599 (1949).
81. *Frédéric Chopin*, Analele Academiei R.P.R., Seria C, **1**, 141 (1949).
82. *Direcțiile noi de cercetare în domeniile permeabilității membranelor*, Analele Academiei R.P.R., Seria Biologie, **3**, 313 (1950).
83. *Reducerea 2-nitrofluorenului și a unor derivați cu ajutorul benzoinei*, în colaborare cu A. Petrescu, Bul. Științ. Academia R.P.R., Seria Biologie, **2**, 113 (1950).
84. *2-cian și 2-amido-p-azoxi-stilbenii substituiți*, în colaborare cu A. Petrescu, Bul. Științ. Academia R.P.R., Seria Biologie, **2**, 209 (1950).
85. *Căutarea metodelor noi de diagnostic biochimic.* Nota III. *Schimbarea în timp a viscozității serului sanguin uman normal și patologic sub acțiunea $HgCl_2$*, în colaborare cu O. Stroescu, Academia R.P.R., Lucrările Sesiunii generale științifice din iunie 1950.
86. *Căutarea metodelor noi de diagnostic biochimic.* Nota IV. *Un model nou de electrodă pentru determinarea pH-ului vaginal in situ*, în colaborare cu M. Rădulescu, Academia R.P.R., Lucrările Sesiunii generale științifice din iunie 1950.
87. *Unele comportări chimice ale nitro-amido-stilbenilor*, în colaborare cu Tr. Rădulescu, Com. Acad. R.P.R., *1*, 355 (1951).
88. *Difuzia acidului acetic prin membrana lichidă toluen-apă și acțiunea unora dintre componentele nesaponifiabilului lipoizilor naturali asupra acestei difuzii*, în colaborare cu C. Iordache, Com. Acad. R.P.R., *1*, 409 (1951).
89. *Acțiunea ciclohexanului ca fază lipoidică nemiscibilă cu apa și a unora dintre componentele nesaponifiabilului lipoizilor naturali asupra activității catalazei hepatice*, în colaborare cu V. Gheorghe, Com. Acad. R.P.R., *1*, 477 (1951).
90. *Iodurile și clorurile sărurilor cuaternare de amoniu ale amidei și acidului N-acetil-nicotinic*, în colaborare cu V. Panaitide, Com. Acad. R.P.R., *1*, (1951).
91. *Acțiunea toluenului și a unora dintre componentele nesaponifiabilului lipoizilor naturali asupra activității polifenoloxidazei din cartofi*, în colaborare cu C. Pretorian, Com. Acad. R.P.R., *1*, 1063 (1951).
92. *Analogia dintre furoină și vitamina C*, în colaborare cu B. Rosenzweig, Com. Acad. R.P.R., *1*, 9 (1951).
93. *Cercetări asupra permeabilității membranelor lichide.* Nota III. *O metodă nouă (metoda picăturilor) pentru cercetarea permeabilității membranelor lichide*, Bul. Științ. Academia R.P.R., Seria Geologie, Geografie, Biologie, Științe tehnice și agricole, **3**, 229 (1951).
94. *Acțiunea cîtorva stilbeni și azocoloranți asupra degradării prin pepsină a ovalbuminei denaturate*, în colaborare cu M. Rădulescu, Bul. Științ. Academia R.P.R., Secția de științe biologice, **3**, 715 (1951).
95. *Fenomenele care se produc în două lichide nemiscibile (apă, toluen) cînd o a treia componentă lichidă (acid acetic) difuzează dintr-o fază în alta*, în colaborare cu L. Vaicum, Bul. Științ. Academia R.P.R., Secția de științe biologice, **3**, 723 (1951).
96. *Cinetica fermentului catalază și calculul constantelor din ecuația respectivă*, Com. Acad. R.P.R., t. II, *1*, 29—34 (1952).
97. *Cîteva considerațiuni teoretice în legătură cu „metoda picăturilor" pentru cercetarea permeabilității membranelor lichide*, Com. Acad. R.P.R., **2**, 137—142 (1952).
98. *Acțiunea hidrocarburilor ca fază lipoidică nemiscibilă cu apa și a unora dintre componentele nesaponifiabilului lipoizilor naturali asupra activității catalazei hepatice de cal*, în colaborare cu V. Gheorghe, Bul. Științ. Academia R.P.R., **3**, 473—488 (1952).
99. *Cercetări preliminare asupra acțiunii unui preparat de cupru și zinc în afecțiunile reumatismale*, Bul. Științ. Academia R.P.R., Secția de științe medicale, **4**, 171 (1952).
100. *Exosmoza ca mijloc de cercetare a evoluției proceselor biochimice în semințele plantelor de cultură și rolul ei în stimularea și germinarea acestor semințe*, Com. Acad. R.P.R., *8*, 1171—1176 (1955).
101. *Exosmoza fosforului anorganic din semințele grîului de toamnă A 15 în cursul iarovizării*, în colaborare cu V. Panaitide, Com. Acad. R.P.R., *5*, 821—826 (1955).
102. *Prepararea din spermă a hialuronidazei brute sub formă de praf*, în colaborare cu M. Cârsteanu, Com. Acad. R.P.R., *10*, 1463—1466 (1955).

103. *Coeficientul de temperatură al consumului de oxigen ca indice biochimic al adaptării semințelor diferitelor soiuri de grîu la condițiile mediului*, în colaborare cu L. Cristea, Com. Acad. R.P.R., *10*, 1467—1471 (1955).
104. *Evoluția glutenului și a ionilor de amoniu ca aspecte ale metabolismului proteic din semințele grîului de toamnă A 15 supuse iarovizării*, în colaborare cu O. Zaharia și N. Moldoveanu, Bul. Științ. Academia R.P.R., **2**, 199—207 (1955).
105. *Razvitie biohimii v Rumînii*, Vestnik Akademii Nauk SSSR, *7*, 91 (1955).
106. *Acțiunea lecitinei asupra pătrunderii novocainei prin membrana lichidă apă-alcool izoamilic*, în colaborare cu L. Botoșăneanu, St. cerc. chimie, *1—2*, 31—38 (1956).
107. *Cercetări conductometrice asupra exosmozei electroliților din piele. Notă preliminară*, în colaborare cu S. Comoroșan, St. cerc. chimie, *3—4*, 271—278 (1956); Arztl. Forsch., **5**, II/41 (1958) (en allemand).
108. *Acțiunea clorhidratului de novocaină asupra permeabilității membranei branchiale vii de Cyprinus carpio pentru saponină*, în colaborare cu D. Cotariu, Com. Acad. R.P.R. **1**, 39—43 (1957).
109. *Deistvie ureazî na urocevinu i β-amilazî na krahmal v prisutstvii nekotorîh gliukoproteinovîh koațervatov*, în colaborare cu S. Vasu și M. Cârsteanu, Revue de Chimie, **2**, 279—285; Com. Acad. R.P.R.. *7*, 933 (1957); St. cerc. biochim., **1**, 297 (1958).
110. *Die Verwendung des Polarographen für potentiometrische pH-Bestimmungen*, în colaborare cu D. Moțet-Grigoraș, Revue de Chimie, **2**, 293—298 (1957); Com. Acad. R.P.R., *8*,781 (1958).
111. *Obrazovanie i povedenie jelatino-gummiarabikovîh koațervatov v prisustvii proteoliticeskih fermentov ipiscevariatelnîh sokov*, în colaborare cu L. Arnet și B. Rozenzweig, Revue de Chimie, **2**, 287—291 (1957); Com. Acad. R.P.R., *5*, 1473—1479 (1955).
112. *Die Verwendung der Kapillarmethode zur Einführung chemischer und biologischer Stoffe in den Pflanzenkörper*, Preslia (Cehoslovacia), **30**, 252 (1958); Com. Acad. R.P.R., *2*, 183—188 (1958).
113. *Aplicarea metodei firului pentru colchicinizări și tratarea plantelor cu substanțe de creștere*, Com. Acad. R.P.R., *2*, 189—193 (1958).
114. *Fosfataznaia, holinesteraznaia i țitohromoksidaznaia aktivnost vnutrikletocinîh obrazovanii mozga i krîs pri razlicinîh funkționalnîh sostoianiah*, în colaborare cu C. Șelariu, S. Mihăescu și S. Vasu, Ukrainskii biohimiceskii jurnal, *1*, 18—26 (1958); Com. Acad. R.P.R., *8*, 275 (1958); St. cerc. biochim., **1**, 9 (1958).
115. *Konduktonetrische Untersuchungen der Elektrolytexosmose aus der Haut*, în colaborare cu S. Comoroșan, Arztl. Forsch., **5**, II/41 (1958).
116. *Institut Biohimii Akademii Nauk R.N.R.*, Biuleten naucinoi informații, nr. 2 (1958).
117. *Cîteva aspecte ale cercetării biochimice în problema stimulării semințelor plantelor apricole*, în *Hommage à M. Popov*, Editura Academiei Bulgare de Științe, Sofia, 1958, p. 169.
118. *Exosmoza hidrochinonei din glomerulele sfeclei de zahăr după stimularea cu această substanță*, în colaborare cu L. Botoșăneanu, St. cerc. biochim., **1**, 177 (1958).
119. *Modificarea metodei G. Bertrand și a tehnicii Bierri pentru dozarea glucozei*, în colaborare cu C. Sarmanioti, St. cerc. biochim., **1**, 271 (1958).
120. *A simplification of Thunberg's method for determining for the activity of dehydrases*, în colaborare cu N. Moldoveanu, Revue de Chimie, **3**, 191 (1958); St. cerc. biochim., **1**, 389 (1958).
121. *Untersuchungen an Koazervaten aus nativen Proteinen*, Zweite Internationale Symposium über den Mechanismus der Erregung, 1958, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.
122. *Acțiunea unor emulsii și a colesterolului coloidal asupra activității amilazei din malț*, în colaborare cu L. Arnet, St. cerc. biochim., **2**, 7 (1959).
123. *Asimilarea azotatului de amoniu introdus în plante de tomate prin metoda capilară*, în colaborare cu O. Zaharia și L. Buzilă, St. cerc. biochim., *2*, 17 (1959).
124. *Coacervatul dintre proteinele serului sanguin uman și guma arabică*, în colaborare cu M. Cârsteanu, St. cerc. biochim., **2**, 111 (1959).
125. *Nekotorîe sootnoșenia mejdu koațervatamii i fermentami*, în *Vozniknovenia jizni na zemle*, Akad. Nauk, Moskva, 1959, p. 441.
126. *Die lebende Materie und ihre Entstehung*, Revue de Chimie, **4**, 11 (1959); *Materia vie și geneza ei*, în *Materialismul dialectic și științele contemporane ale naturii*, Edit. politică, București, 1959, p. 155.
127. *Metoda capilară și aplicarea ei în biochimia plantelor*, în *Hommage à Tr. Săvulescu*, Academia R.P.R., 1959, p. 1073.
128. *Deistvie prolina na aminokisloti i belki podsolnecinika*, în colaborare cu O. Zaharia, Revue de Chimie, **6**, 67 (1961); St. cerc. biochim., **3**, 7 (1960).
129. *Einige Beobachtungen über das Verhalten der Proteine und einiger proteinhaltiger Bildungen*, III. Humbold Symposion über Grundfragen der Biologie, Berlin, 21—26 sept. 1960.

130. *K voprosu o cletocinîh membranah i ih proniţaemosti*, Revue de Chimie, **7**, 309 (1962); St. cerc. biochim., **4**, 9 (1961).
131. *Relaţiile dintre amilaza, lipaza şi fosfataza alcalină din serul sanguin uman şi coacervatul obţinut din acest ser cu guma arabică*, în colaborare cu L. Arnet, St. cerc. biochimi., **4**, 15 (1961).
132. *Le phosphagène dans différents états d'activité et d'excitabilité musculaire*, în colaborare cu C. Iordache şi C. Dragomirescu, Biochim. Biol. Sperim., **1**, 319 (1961—1962); St. cerc. biochim., **4**, 171 (1961).
133. *Factorii fizico-chimici şi metabolici în transportul diferitelor soluţii în plante*, în colaborare cu V. Frunzeti şi L. Botoşăneanu, St. cerc. biochim., **4**, 427 (1961).
134. *Wie entstand das Leben*, Urania-Verlag, Leipzig-Jena-Berlin, 1961.
135. *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcţionale ale muşchiului*, în colaborare cu C. Iordache, St. cerc. biochimî., **5**, 207 (1962).
136. *Perspektivi biohimiceskih issledovanii pri veghetativnoi hibridizaţii rastenii*, Vestnik seliskohozeaistvennoi nauki, *3*, 149 (1963); Biuletin naucinoi informaţii, **1**, 7 (1962); Biochim. Biol. Sperim., **2**, 99 (1962—1963) (en français); St. cerc. biochim., **5**, 193 (1962).
137. *Procedeu pentru măsurarea endosmozei iodului în colul uterin*, în colaborare cu A. Mihăescu şi A. Popescu, St. cerc. biochim., **5**, 113 (1962).
138. *Cercetarea structurii coacervatelor prin metoda citologică*, în colaborare cu I. Steopoe şi S. Ceauşescu St. cerc. biochim., **5**, 323 (1962).
139. *Exosmoza fosforului anorganic ca test al stării muşchiului. Notă preliminară*, în colaborare cu Tr. Rădulescu şi L. Scolnic, St. cerc. biochim., **5**, 485 (1962).
140. *Cum se transformă hrana în putere*, ed. a 3-a, C.R.C.C.S., Bucureşti, 1962.
141. *Migrarea pironinei şi albastrului de metilen prin tulpini de balsamide şi tomate. Teoria adsorbtivă a migrării substanţelor în plante*, în colaborare cu V. Frunzeti şi S. Rădulescu, St. cerc. biochim., **6**, 23 (1963).
142. *Einige neue Anschaungen über die Natur der lebenden Materie in Beziehung zur Biochemie des Krebses*, Vitalstoffe Zivilisationskraukh. **8**, 48 (1963).
143. *Kapilliarnîi metod i perspektivi ego primeneniea*, Seliskoe hozeaistvo za rubejom, *3*, 31 (1963).
144. *Coeficienţii izometrici şi relaţiile dintre efort şi fosfagenul muscular*, în colaborare cu C. Iordache, St. cerc. biochim., **6**, 181 (1963).
145. *Materia vie şi rolul ei în hibridarea plantelor*, St. cerc. biochim., **6**, 4 (1963).
146. *Metoda despicării pentru cercetări biochimice comparative la plante*, în colaborare cu L. Botoşăneanu, St. cerc. biochim., **6**, 4 (1963).
147. *Nekotorîe aspekti kibernetiki i struktura jivoi materii (Predvaritelnoe soobscenie)*, Rev. roum. Biochim., **1**, 5—10 (1964); St. cerc. biochim., **7**, 5—8 (1964).
148. *Méthode pour déterminer l'exosmose des électrolytes du col utérin*, în colaborare cu M. Cârsteanu şi A. Popescu, Rev. roum. Biochim., **1**, 119—122 (1964); St. cerc. biochim., **7**, 151—154 (1964).
149. *Introduction et distribution de la péroxydase de rainfort dans les plantes de tomates*, în colaborare cu S. Rădulescu, Rev. roum. Biochim., **1**, 245—250 (1964); St. cerc. biochim., **7**, 315—320 (1964).
150. *La structure de la matière vivante et quelques aspects cybernétiques de ce problème. Note préliminaire*, Vitalstoffe Zivilizationskrankh. **IX**, *2* (40), 39 (1964).
151. *Kibernetik in Organismischen*, Vitalstoffe Zivilizationskrankh. **IX**, *3* (41), 89 (1964).
152. *Some problems of regulation mechanism and of living matter structure*, Rev. roum. Biochim., **2**, 189—204 (1965); St. cerc. biochim., **8**, 253—270 (1965).
153. *Living matter and the asymmetrical distribution of electrolytes between protoplasm and interstitial fluid. Basis of the theory of structure as compared to the basis of membrane and sorption theories*, Rev. roum. Biochim., **2**, 285—326 (1965); St. cerc. biochim., **8**, 371—410 (1965).
154. *Teoria structurii şi repartiţia electroliţilor dintre lichidul de perfuzie şi muşchii trenului posterior de broască*, St. cerc. biochim., **9**, 123 (1966); Rev. roum. Biochim., **3**, 169 (1966) (en anglais).
155. *Materia vie şi premise ale unei teorii moleculare a memoriei*, St. cerc. biochim., **9**, 231 (1966); Rev. roum. Biochim., **3**, 249 (1966) (en anglais).
156. *Materia vie şi problema raporturilor dintre medicamente şi enzime*, St. cerc. biochim., **9**, 3 (1966); Rev. roum. Biochim., **3**, 321 (1966) (en anglais).
157. *Materia vie şi unele aspecte cibernetice ale structurii ei*, în *Omagiu lui-C. I. Parhon*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1966.
158. *Unele perspective ale investigaţiilor cantitative în cadrul teoriei moleculare a memoriei*, St. cerc. biochim., **10**, 3 (1967); Rev. roum. Biochim., **4**, 17 (1967) (en anglais).
159. *The structure theory the state of protoplasm water and the problem of plant sap origin*, în colaborare cu I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **4**, 235 (1967).
160. *The living mater and the relationship between noxious substances and drugs*, Rev. roum. Biochim., **5**, 3 (1968).

161. *Le rôle de la biostructure dans le mécanisme d'action des hormones*, Rev. roum. Biochim., **5**, 253 (1968); Vitalstoffe Zivilisationskrankh., **14**, 17 (1969) (en allemand).
162. *Teoria biostructurii și problema transportului activ al ionilor de sodiu în axonii giganți de Sepia*, St. cerc. biochim., **11**, 275 (1968).
163. *La phospatase acide et le phosphore inorganique dans les socs des feuilles de chou*, în colaborare cu V. Frunzeti, Rev. roum. Biochim., **5**, 165 (1968).
164. *Potassium, calcium and sodium ions in corn leef saps*, în colaborare cu I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **5**, 257 (1968).
165. *Cantitatea și concentrația sucurilor provenite din frunze de varză încălzite la temperaturi diferite. Considerații în lumina teoriei biostructurii*, în colaborare cu A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **11**, 337 (1968).
166. *Acțiunea inhibitorilor metabolici asupra efluxului și influxului ionilor de sodiu la axonii giganți de Sepia. Considerații în lumina teoriei biostructurii*, St. cerc. biochim., **12**, 5 (1969).
167. *Eliberarea parțială a apei biostructurate în prezența inhibitorilor metabolici*, St. cerc. biochim., **12**, 105 (1969).
168. *Testarea valabilității teoriei biostructurii*, St. cerc. biochim., **12**, 209 (1969.)
169. *Role of biostructure in the genesis of intracellular formations. Preliminary note*, Rev. roum. Biochim., **6**, 3 (1969).
170. *Eliberarea apei și a altor substanțe din biostructura frunzelor de porumb sub acțiunea inhibitorilor metabolici*, în colaborare cu V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
171. *Ribonucleazele în sucurile frunzelor de porumb. Considerații în lumina teoriei biostructurii*, în colaborare cu V. Fruneti-Elefterescu, St. cerc. biochim., **12**, 115 (1969).
172. *The reducing sugars in saps of cineraria, lettuce and cabbage leaves. Some considerations in the light of biostructure theory*, în colaborare cu C. Mușolan, Rev. roum. Biochim., **6**, 89 (1969).
173. *La biostructure et les inhibiteurs du métabolisme, leur importance pour la médecine*, Vitalstoffe Zivilisationskrankh., **15**, 48 (1970).
174. *Influența inhibitorilor metabolici asupra compoziției lichidului intracelular al frunzelor de porumb*, în colaborare cu M. Rabega, St. cerc. biochim., **13**, 219 (1970).
175. *Teoria biostructurală a undelor electroencefalografice*, St. cerc. biochim., **13**, 331 (1970); Protectio vitae, **1**, 30 (1971).
176. *Demonstrarea existenței biostructurii*, St. cerc. biochim., **14**, 239 (1971).
177. *Some new ideas about the life origin*, Protectio vitae, **1**, 129 (1971); Biochim. Biol. Sperim., **9**, 255 (1971).
178. *Eliberarea apei, a substanțelor hidrosolubile și a ionilor de potasiu și calciu din biostructura fructelor de măr și a frunzelor de varză în cursul păstrării*, în colaborare cu I. Cornoiu, St. cerc. biochim., **14**, 255 (1971).
179. *The problem of sodium, ion efflux from living giant axons of Sepia*, în colaborare cu Fl. Mosora, Rev. roum. Biochim., **8**, 97 (1971).
180. *The bases of biostructure theory. The necessity of elaborating a new conception about the nature of living matter*, Biochim. Biol. Sperim., **10**, 138 (1972).
181. *The biostructure as a cell ultrastructure*, Rev. roum. Biol., 17, 137 (1972).
182. *La biostructure et sa signification pour l'allergologie*, Protectio vitae, **2**, 214 (1972).
183. *The influence of 2,4-dinitrophenol and arsenite upon the amount and the repartition of piruvate between the intracellular solution and the biostructure of leaves of maize plantlets*, în colaborare cu V. Elefterescu, Rev. roum. Biochim., **9**, 192 (1972).
184. *Die Beziehungen zwischen der Homöopathie und Allopathie im Lichte der Biostrukturtheorie*, Rev. roum. Biochim., **10**, 255 (1973).
185. *Bazele filozofice ale conceptiei biostructurale*, St. cerc. biochim., **16**, 349 (1973).
186. *Prévision de l'apparition des nouvelles conception scientifiques*, Rev. roum. Biochim., **10**, 3 (1973).
187. *Activitatea o-asparaginazei și o-alanin-o-cetoglutarat-aminotransferazei în sucurile stoarse din mere păstrate la temperaturi coborîte*, în colaborare cu A. Gherghi, C. Rabega, M. Rabega și C. Mihăescu, St. cerc. Biochim., **17**, 5 (1974).
188. *Cercetarea bioctructurii țesutului muscular striat de iepure*, în colaborare cu O. Macovschi, St. cerc. biochim., **19**, 151 (1976).
189. *Sedimentation rate of the coacervates formed from arabic gum and blood serum proteins from normal cases and rheumatical or uterine neocollum patients*, în colaborare cu M. Bădescu, Biochem. Exp. Biol., **12**, 93 (1976).
190. *Nature of living matter*, Biochem. Exp. Biol., **12**, 119 (1976).
191. *The material background of abstract thinking*, Biochem. Exp. Biol., **12**, 245 (1976).
192. *Investigation of the muscle tissue biostructure by means of the pressing-out method. I. Pressing out dynamics of the saps obtained from the striated muscle tissue*, în colaborare cu O. Macovschi, Biochem. Exp. Biol., **12**, 347 (1976).

193. *The origin of life in the light of the biostructural theory*, Rev. roum. Biochem., **16**, 107 (1979).
194. *The biochemical paradox*, Rev. roum. Biochim., **16**, 209 (1979).
195. *The biostructural hypothesis about matter structurality in Univers*, Rev. roum. Biochim., **16**, 281 (1979).
196. *The biostructural theory and the criticism of contemporary molecularism*, Biochem. Exp. Biol., **15**, 173 (1979).
197. *The biostructural water*, Rev. roum. Biochim., **17**, 39 (1980).
198. *The biostructural thinking in ecology*, Rev. roum. Biochim., **17**, 253 (1980).
199. *La théorie biostructurale et ses rapports avec la psychiatrie*, Rev. roum. Biochim., **18**, 27 (1981).
200. *The validity of biostructural theory*, Rev. roum. Biochim., **18**, 113 (1981).
201. *Biosical and noesical matter and their fields*, Rev. roum. Biochim., **18**, 267 (1981).
202. *La matière de l'Univers conçue selon la conception biostructurale*, Rev. roum. Biochim., **19**, 133 (1982).
203. *The confirmation of the biostructural theory by high voltage electron microscopy*, Rev. roum. Biochim., **19**, 177 (1982).
204. *The molecular theories and the biostructural conception*, Rev. roum. Biochim., **20**, 77 (1983).
205. *The biostructural theory of cancerogenesis*, Rev. roum. Biochim., **21**, 3 (1984).
206. *The noesic field and human thought*, Rev. roum. Biochim., **21**, 249 (1984).
207. *Thinking as related to the nature of the living matter*, Rev. roum. Biochim., **22**, 87 (1985).

LISTA CĂRȚILOR PUBLICATE DE ACADEMICIANUL EUGEN MACOVSCHI

1. *Din ce este alcătuită hrana noastră?* nr. 46 din colecția Societății pentru răspîndirea științei și culturii, Edit. de Stat pentru literatură științifică, București, 1952.
2. *Biostructura*, Edit. Academiei, București, 1969.
3. *Natura și structura materiei vii*, Edit. Academiei, București, 1972.
4. *Priroda i struktura jivoi materii*, Edit. Academiei, București, 1976.
5. *Biostrukturnaia teoriea i kritika sovremennogo molekularisma*, Tipografia Universității București, 1977.
6. *The biostructural theory and the criticism of contemporary molecularism*, Tipografia Universității București, 1978.
7. *Teoria biostructurală*, în *Probleme actuale în biologie*, III, Edit. didactică și pedagogică, București, 1978.
8. *The confirmation of the biostructural theory by the high-voltage electron microscopy*, Edit. științifică și enciclopedică, București, 1981.
9. *Geneza și firea materiei vii*, în *Combaterea poluării, protecția vieții*, sub red. Al. Ionescu și N. Andronache, Casa jud. Corp. did. Deva, 1981.
10. *Concepția biostructurală și teoriile moleculare ale materiei vii*, Edit. științifică și enciclopedică, București, 1984, 50 p. (și traducerea în limbile enlgeză și rusă).
11. *Dialectica materiei vii*, curs de biochimie, Centrul de multiplicare al Universității București, 1974.
12. *Substratul material al gîndirii abstracte*, curs de biochimie, Centrul de multiplicare al Universității București, 1975.
13. *The origin of life in the light of the biostructural theory*, Tipografia Universității București, 1978.
14. *Aspects philosophiques dans la genèse et le développement de la théorie biostructurale*, Tipografia Universității București, 1978.

INVENȚII

1. *Produs pentru sămăluirea pieilor*, Brevet de invenție nr. 47026, 1967.
2. *Procedeul de conservare a fructelor*, Brevet de invenție nr. 62602, 1973.

MATERIA BIOSTRUCTURALĂ, DE LA IPOTEZĂ LA CERTITUDINE ȘTIINȚIFICĂ

EUGENIU NICULESCU-MIZIL

Teoria biostructurală este o teorie nouă despre natura și structura materiei vii, elaborată ca urmare a cercetărilor întreprinse de savantul român academicianul Eugen Macovschi. Principiile acestei teorii au fost publicate pentru prima oară de autor în anii 1958–1959. De atunci și pînă în prezent cercetările teoretice și experimentale întreprinse pe această linie au generat apariția a trei cărți și a circa 150 de studii și articole legate de teoria biostructurală.

Noua teorie exprimă un mod nou de gîndire privind natura viului, care se deosebește fundamental de modul de gîndire caracteristic *teoriei moleculare* a materiei vii.

Diferențele esențiale dintre cele două teorii cu privire la natura viului sînt redate în continuare.

TEORIA MOLECULARĂ	TEORIA BIOSTRUCTURALĂ
— *Materia vie este constituită dintr-o singură formă a materiei (combinații chimice) aflată într-o singură stare (moleculară).*	— *Materia vie este constituită din două forme ale materiei, combinații chimice aflate în stare biostructurată, specifică viului (materie biostructurată), și combinații chimice aflate în stare moleculară obișnuită (materia moleculară coexistentă).*
— *În materia vie se produce un singur fel de transformări (cele chimice).*	— *În materia vie se produc trei feluri de transformări: biostructurale, metabolice și chimice.*
— *Metabolismul constă în coordonarea riguroasă a reacțiilor chimice din organism.*	— *Metabolismul constă în schimbul de substanță dintre materia biostructurată și materia moleculară coexistentă, depășind chimismul obișnuit.*
— *Asimilația (anabolismul) și dezasimilația (catabolismul) sînt procese chimice obișnuite, iar termenii din cele două perechi sînt sinonimi.*	— *Asimilația depășește anabolismul, termenii respectivi nefiind sinonimi (la fel ca în cazurile dezasimilație—catabolism).*
— *Fenomenele biologice se reduc la chimismul obișnuit.*	— *Fenomenele biologice depind de procese ce depășesc chimismul, derivînd din funcțiile exercitate de componentele biostructurii.*
— *Viața se reduce la forma chimică de mișcare a materiei.*	*Viața, forma biologică de mișcare a materiei, depășește forma chimică de mișcare, pe care însă o înglobează sub un aspect depășit, subordonat.*

St. cerc. biochim., 28, 2, 115–124 (1985)

— *Moartea este consecința încetării metabolismului.*

— *Între natura materiei vii și cea a materiei moarte nu este nici deosebire.*

— *Moartea este consecința destrămării materiei biostructurate cuprinse în viu.*

— *Materia vie și materia moartă isînt distincte ca natură a lor.*

Concluziile la care a ajuns academicianul Eugen Macovschi și care au fundamentat tezele menționate ale teoriei biostructurale sînt consecința unor îndelungi cercetări și experimente întreprinse, ele permițînd verificarea acestei teorii pe baza a cinci criterii diferite : *criteriul previziunii* și *criteriul reevaluării*, care țin de calea experimentală de verificare, *criteriul proliferării* și *criteriul extinderii*, care țin de calea teoretică de verificare, și *criteriul reciprocității*, care ține de calea filozofică de verificare.

Cercetările, experimentele și rezultatele obținute pe linia celor cinci criterii diferite de verificare sînt, în esență, următoarele (1) :

1. **Criteriul previziunii.** Utilizîndu-se cinci procedee diferite : metoda stoarcerii, dozarea apei libere, măsurarea vitezei de evaporare a apei, rezonanța magnetică nucleară de înaltă rezoluție și rezonanța magnetică nucleară ecou de spin, s-a indentificat și explicat trecerea parțială a apei din starea organizată în stare liberă (eliberarea *apei biostructurate* prin destrămarea parțială a *materiei biostructurate*), fenomen provocat de inhibitori biochimici, neprevăzut și neexplicabil prin teoriile bazate pe concepția moleculară.

2. **Criteriul reevaluării.** Reexaminarea în lumina teoriei biostructurale a două lucrări experimentale efectuate anterior : perfuzia trenului posterior de broască, executată de cercetătorii germani Mond și Amson în anul 1928, și efluxul ionilor de sodiu din axoni de *Sepia*, executat de cercetătorii englezi Hodgkins și Keynes în anul 1955, a demonstrat că rezultatele privind schimbul de ioni (K^+ și Na^+) dintre țesuturile vii și mediul ambiant capătă o interpretare mai corectă și duc la alte concluzii, noi, calitativ superioare celor stabilite pe baza *teoriei moleculare*.

3. **Criteriul proliferării.** Teoria biostructurală a materiei vii a permis elaborarea mai multor ipoteze și teorii noi în biologie, ca :

— teoria biostructurală a permeabilității celulare ;

— premisele unei teorii biostructurale a memoriei umane ;

— ipoteza privind relațiile dintre noxe și medicamente ;

— ipoteza biostructurală a originii undelor electroencefalografice ;

— o nouă ipoteză a originii vieții pe Pămînt ;

— teoria biostructurală privind starea apei în organisme vii și moarte ;

— ipoteza pluralității nivelurilor structurale ale materiei în Univers și altele.

4. **Criteriul extinderii.** Teoria biostructurală a fost extinsă la materia vie a scoarței cerebrale umane, arătînd că, pe lîngă materia vie obișnuită, în scoarță și în formațiunile subcorticale există materie vie, superior organizată comparativ cu materia biosică obișnuită. Această materie, numită noesică, reprezintă substratul material al gîndirii abstracte.

5. **Criteriul reciprocității.** Conform principiului promovării reciproce, teoria biostructurii, beneficiind de metodica materialismului dialectic, a condus la relevarea unor noi aspecte filozofice, ca :

— precizarea parametrilor dialectici prin care dialectica materialistă caracterizează și definește obiectele cercetate de ea ;

— stabilirea procedeului comportării adaptării calităţilor;
— elaborarea principiului unităţii calităţilor;
— adaptarea dialecticii dezvoltării la materia vie;
— stabilirea (în ceea ce priveşte natura viului) a trei forme de existenţă a materiei: moleculară, biosică şi noesică;
— conturarea unei noi căi de verificare a teoriilor ştiinţifice;
— constatarea că Friedrich Engels este precursor al teoriei biostructurale.

Faptul că teoria biostructurală satisface aceste cinci criterii de verificare, în timp ce teoria moleculară a materiei vii nu a fost supusă unei asemenea verificări, este de natură să dovedească justeţea ei şi aceasta constituie un prim aspect important al problemei.

Un alt aspect important îl constituie faptul că teoria biostructurală a fost verificată printr-o experienţă crucială, la fel cum Jean Perrin (1870—1942) a procedat în experienţa sa decisivă pentru verificarea valabilităţii teoriei moleculare în fizică şi în chimie. Despre ce este vorba? Pentru verificarea valabilităţii unei teorii noi se recurge de obicei la aşazisa experienţă decisivă, care, prin răspunsul „da" sau „nu", demonstrează dacă teoria este sau nu valabilă. O astfel de experienţă trebuie să îndeplinească două condiţii extrem de greu de satisfăcut. Prima: teoria supusă verificării trebuie să permită prevederea unui fapt ştiinţific nou şi care totodată să nu fie nici previzibil pe baza altor criterii existente. A doua: cercetările experimentale adecvate trebuie s ă permită descoperirea faptului ştiinţific prevăzut.

Se ştie că bazele teoriei moleculare au fost elaborate la începutul secolului trecut de J. Dalton, A. Avogadro şi alţii. Această teorie a început să se dezvolte, găsind tot mai multe aplicaţii în diferite domenii ale chimiei şi fizicii, dar existenţa obiectivă a moleculelor rămînea nedemonstrată. De aceea, unii chimişti şi fizicieni nu credeau în existenţa moleculelor, nu acceptau teoria moleculară şi o combăteau. La începutul secolului nostru, J. Perrin s-a decis să lămurească controversa printr-o experienţă hotărîtoare. Pe baza teoriei moleculare, a reuşit să prevadă un fapt ştiinţific nou. Dacă în adevăr mişcarea browniană se datoreşte mişcării termice a moleculelor mediului, atunci cercetarea experimentală a acestei mişcări de pe poziţiile teoriei cinetice statistice a lui Maxwell şi ale teoriei mişcării browniene Einstein-Smoluchowski ar trebui să permită stabilirea experimentală a numărului lui Avogadro (constanta universală), dedus pînă atunci numai pe baza unor calcule teoretice; la acelaşi rezultat ar trebui să ducă şi cercetarea fenomenelor de transport în suspensii, ţinînd seama de ecuaţia Laplace, precum şi cercetarea compresibilităţii osmotice.

J. Perrin şi şcoala sa au procedat metodic la efectuarea cercetărilor experimentale adecvate prin cinci metode de investigaţie diferite şi independente (metoda echilibrului de sedimentare, metoda mişcării browniene de translaţie, metoda mişcării browniene de rotaţie, metoda difuziei şi metoda compresibilităţii osmotice), lucrînd pe suspensii de natură diferită în condiţii variate. Cercetările au dus la descoperirea faptului ştiinţific prevăzut. S-a constatat că cele cinci metode de investigaţie au dat pentru numărul lui Avogadro valori apropiate de valoarea cunoscută teoretic. Astfel, experienţa crucială efectuată de J. Perrin a răspuns „da", demonstrînd decisiv valabilitatea teoriei moleculare şi existenţa moleculelor. De atunci, teoria moleculară şi existenţa moleculelor au fost unanim acceptate, iar experienţa lui J. Perrin a devenit celebră (2).

Dacă în timpul cînd Perrin cerceta mişcarea browniană moleculele ar fi fost „văzute", nu ar fi devenit necesară experienţa amintită. Cîteva decenii după experienţa lui J. Perrin, progresul tehnic a permis fotografierea moleculelor unor substanţe, ca ftalocianina de cupru, colagenul, alcool dehidrogenaza şi altele, ceea ce a demonstrat, fără putinţă de tăgadă, faptul ştiinţific prevăzut iniţial.

La fel s-a petrecut şi cu teoria biostructurală a materiei vii. Legat de vizualizarea concretă a biostructurii problemă care mai susciţă încă discuţii, profesorul Macovschi arăta : „încă nu am văzut biostructura cu ochii mei, dar o văd cu ochii minţii" (1). În această ordine de idei trebuie considerate, pe de o parte, înseşi opiniile celui ce a elaborat teoria biostructurală. Astfel, în acelaşi studiu (1) este precizat că vizualizarea biostructurii este în prezent nerezolvată datorită faptului că, în organismele vegetale sau animale care şi-au pierdut viaţa, această biostructură nu mai poate fi văzută, deoarece acolo ea nu mai există, este destrămată.

Dar din anul 1958, cînd au fost puse bazele acestei teorii, pînă în anul 1969, această teorie a început să se dezvolte, găsind aplicaţii în diferite domenii ale biologiei. Existenţa obiectivă a biostructurii rămînea însă nedemonstrată, De aceea, unii biologi nu credeau în existenţa biostructurii şi nu acceptau teoria biostructurală. În jurul anului 1969, profesorul Macovschi a pornit să lămurească situaţia printr-o experienţă decisivă. Pe baza teoriei biostructurale a reuşit să prevadă un fapt ştiinţific nou. Dacă în adevăr integritatea biostructurii depinde de aportul de energie furnizată de biochimismul celular, atunci scăderea intensităţii biochimismului, şi deci scăderea aportului de energie, ar atribui să ducă la destrămarea parţială a biostructurii şi la eliberarea parţială a apei şi a substanţelor hidrosolubile cuprinse în ea. Prin urmare, ţesuturile vii tratate cu inhibitori ai biochimismului ar trebui să conţină mai multă apă liberă şi o cantitate sporită de substanţe hidrosolubile libere decît ţesuturile martor. Acest fapt ştiinţific, prevăzut dar nerecunoscut atunci, era şi este imprevizibil şi de neconceput de pe poziţiile părerilor de atunci despre natura materiei vii. În adevăr, conform acestor păreri şi teoriilor membranei, sorbţiei (D. N. Nasonov) şi asociaţiei inducţiei (G. N. Ling) derivate din ele, proporţia apei libere în ţesuturi este independentă de biochimism şi, prin urmare, nu poate fi influenţată de inhibitori ai acestuia.

S-a trecut la efectuarea cercetărilor experimentale adecvate prin cinci metode de investigaţie diferite şi independente, pe care le-am menţionat cînd ne-am referit la criteriul previziunii (metoda stoarcerii, metoda dozării apei libere, metoda vitezei de evaporare, metoda rezonanţei magnetice nucleare de înaltă rezoluţie şi metoda rezonanţei magnetice nucleare ecou de spin) lucrîndu-se pe ţesuturile vii vegetale şi animale în condiţii variate. Cercetările au dus la descoperirea faptului ştiinţific prevăzut. S-a constatat că cele cinci metode de investigaţie au dat acelaşi rezultat, arătînd un conţinut sporit de apă liberă şi de substanţe vii tratate cu inhibitorii menţionaţi. Astfel, această experienţă a răspuns „da", demonstrînd decisiv valabilitatea teoriei biostructurale şi existenţa biostructurii. Dacă investigaţiile ar fi arătat că inhibitorii biochimici nu modifică proporţia apei libere şi a substanţelor hidrosolubile libere în ţesuturile vii sau provoacă scăderea proporţiei lor, răspunsul ar fi fost „nu" şi existenţa biostructurii ar fi rămas nedemonstrată (2).

Deci, existenţa biostructurii ca formă esenţială ce caracterizează materia vie este dovedită atît prin rezultatul experimentărilor care au dus

la satisfacerea celor cinci criterii de verificare menționate, și cît prin experiența crucială descrisă, care nu a fost aplicată și teoriei moleculare a materiei vii, în scopul verificării ei.

CRITERIUL SISTEMIC DE VERIFICARE AL TEORIEI BIOSTRUCTURALE

Încercînd o interpretare sistemică a materiei în starea sa vie după concepția profesorului Macovschi, cercetările întreprinse de noi pentru a interpreta din punct de vedere cibernetic tezele și preceptele din teoria biostructurală ne-au permis elaborarea unui al șaselea criteriu de verificare, *criteriul sistemic* (3), care ține de calea teoretică de verificare.

Astfel, conform teoriei biostructurale, noi am putut descrie materia vie ca un sistem cibernetic ierarhizat pe două, și, respectiv, trei niveluri, compus din două, respectiv trei, subsisteme : materia moleculară coexistentă, materia biostructurată și materia noesistructurată (pentru ființele ce gîndesc abstract), subsisteme care se întrepătrund și se intercondiționează și în care :

— intrarea (absorbția) și ieșirea (excreția) din sistem constituie diabasismul sistemului ;

— conexiunea dintre cele două, respectiv trei, subsisteme este asigurată de asimilație și asimilație noesică, iar conexiunea inversă de dezasimilație noesică ;

— reglarea este realizată cu ajutorul bioenergiei, avînd ca efect schimbarea moleculelor în componente ale biostructurii și ale noesistructurii, iar autoreglarea este realizată cu ajutorul modificărilor și mișcărilor din materia noesistructurată, din materia biostructurată și din materia moleculară coexistentă, prin coordonarea noesistructismului, a biostructismului, a biochimismului și a compoziției chimice ;

— procesele locale din cele două, respectiv trei, subsisteme (biochimismul la nivelul materiei mcleculare coexistente, biostructismul la nivelul materiei biostructurate și, respectiv, noesistructismul la nivelul materiei noesistructurate), împreună cu procesele generale (metabolismul), determină modificările de stare în subsisteme și în sistemul materiei vii.

Și acest fapt a fost de natură să întărească convingerea științifică cu privire la justețea teoriei biostructurale.

TEORIA BIOSTRUCTURALĂ ȘI DEZVOLTAREA BIOLOGIEI

Pe lîngă cercetările academicianului Macovschi, trebuie luate în considerare experimentările efectuate și de alți oameni de știință care confirmă, direct sau indirect, existența materiei în stare biostructurată. Astfel, într-un laborator de biofizică al Universității din Alma Ata în anul 1980 și-au confruntat opiniile doi cercetători, unul doctor în medicină, altul doctor în biologie. Ei studiau natura unui fenomen — autohipnoza — în timpul căruia, se pare, cantitatea de plasmă biologică (bioplasma) crește în organism. Prin bioplasmă se înțelege existența materiei vii, dar nu sub forma de atomi și molecule, ci sub cea a particulelor încărcate, electronii zișI liberi.

Savantul Iniushin a elaborat la Alma Ata ipoteza bioplasmei, iar savantul român Eugen Macovschi a arătat că această bioplasmă este purtată de materia biostructurată (de biostructură) (4). Subliniind prioritatea sa-

vantului român în cercetările legate de structura materiei vii, în anul 1974, V. M. Iniushin (arăta : „Termenul de bioplasmă a fost propus de V. S. Grishtchenko în anul 1966. Sub termenul de bioplasmă, autorul presupune atomi ipotetici x. Autorul însă nu a dat o interpretare fizică esenței atomilor x. Apoi, concepția a fost dezvoltată într-o serie de lucrări ulterioare (V. M. Iniushin, 1969, 1972, 1973) ... Independent de noi, ipoteza unor stări deosebite (concepția biostructurilor) a fost dezvoltată de academicianul E. Macovschi încă din anul 1949 la București" (5).

Dar, în ultimul timp, mulți oameni de știință și-au însușit și menționează sau tratează în lucrările lor teoria biostructurală.

Academicianul sovietic A. I. Oparin, creator al teoriei originii vieții pe Pământ, recunoștea, înte-o scrisoare adrestă în anul 1962 academicianului Eugen Macovschi, importanța științifică a teoriei biostructurale, pasul înainte pe care aceasta îl determină în progresul cunoașterii științifice, precum și perspectiva pe care ea o deschide în interpretarea sistemică, în viziunea cibernetică a fenomenelor biologice, spunînd : „...lucrările academicianului Eugen Macovschi de la Academia Română de Științe prezintă un mare interes deoarece oferă o nouă abordare pentru înțelegerea fenomenelor biologice din punctul de vedere al autoreglării proceselor ce se desfășoară pe socoteala modificării structurilor la nivelul cărora se produc aceste procese. În legătură cu aceasta se deschide posibilitatea pentru abordarea cibernetică a fenomenelor biologice cu aplicarea teoriei legăturii inverse" (6).

În aceeași ordine de idei, dar subliniind și mai mult caracterul revoluționar al teoriei biostructurii, precum și caracterul ei de certitudine științifică, profesorul A. M. Sutulov de la Universitatea din Moscova, fost director al Grădinii botanice de aici scria : „Teoria dumneavoastră interesantă despre natura vie este atît de originală și nouă, încît pentru înțelegerea ei deplină este necesar un studiu serios și atent ... Postulatul dumneavoastră că molecula, înglobîndu-se în structura materiei vii, își pierde specificitatea și încetează a mai fi moleculă, dar își recapătă înapoi specificitatea sa cînd se elimină din structura materiei vii, trebuie acceptat" (6).

În tratatul său „Biologie generală", profesorul român Nicolae Bodnariuc, membru corespondent al Academiei R. S. România, arăta : „Cu privire la structura materiei vii (a protoplasmei) nu există o unitate de păreri. În interpretarea acestui fenomen, majoritatea autorilor, pornesc în esență de la ideea că moleculele diferitelor substanțe chimice din componența protoplasmei au o comportare asemănătoare cu cea pe care o au „in vitro" (în stare izolată) în materia nevie. O părere deosebită a emis, în această privință, E. Macovschi, care pornește de la ideea că « protoplasma vie este alcătuită din două feluri distincte de materie, formate din aceleași materiale — materia vie și materia nevie —, care se întrepătrund și se află în relații de coexistență funcțională ». Materia vie, care se formează prin asimilarea diferitelor substanțe ale materiei nevii, are o structură specială *(biostructura)* și imprimă întregii protoplasme comportarea caracteristică, biologică. *Biochimismul* protoplasmei cuprinde procesele ce se desfășoară în materia nevie a protoplasmei, iar cele ce au loc în materia vie constituie *metabolismul* ei (asimilația, deci integrarea substanțelor chimice în structura materiei vii, și dezasimilația, ieșirea lor din structura materiei vii). Prin integrarea substanțelor chimice în materia vie se produc schimbări importante ale unor însușiri ale lor, fără a afecta în mod principial structura lor chimică. Integrarea în materia vie duce la apariția unor particularități

noi, care se pierd odată cu ieșirea substanței din materia vie. În felul acesta, *structura materiei vii nu poate fi echivalată cu structura componentelor chimice ale ei*, ea nu este o entitate aditivă, ci reprezintă un „întreg" cu însușiri și calități proprii ale întregului, în care componentele integrate în partea vie a protoplasmei sînt stări și interacțiuni speciale, acelea care dau naștere mișcării biologice. Această ipoteză deschide un important domeniu de cercetare a materiei vii prin prisma integrității ei" (7).

Tezele teoriei biostructurale cu privire la forma de existență a materiei în stare vie sînt din ce în ce mai mult acceptate în special de către oamenii de știință din domeniile biologiei și medicinii, astfel că seria exemplelor ar putea continua.

DICȚIONARELE ȘI TEORIA BIOSTRUCTURII

Unele dintre dicționarele specializate în domeniile biologiei și medicinei sau cele enciclopedice au astăzi legătură cu teoria biostructurală. Unele explică, iar altele se apropie de termenul de biostructură.

a) Dintre dicționarele ce se referă direct la teoria biostructurală vom menționa două.

În „Dicționarul practic de biologie agricolă", autorii, prof. dr. doc. Alexe Potlog și prof. dr. doc. Vasile Velican, membru corespondent al Academiei R. S. România, definesc: „*Biostructura*, parte din materia protoplasmei vii, purtătoare a proprietăților specifice vieții, integrată într-o structură cu totul specială, indisolubil legată de substanța intracelulară, de la care primește atît energia necesară menținerii integrității sale, cît și substanțe ce devin componente ale ei. Sinonim *materia biostructurată*. Integritatea moleculelor diferitelor substanțe intracelulare în *b* necesită un aport energetic specific. Componentele *b* nu prezintă alcătuirea moleculară caracteristică materiei vii, deși acestea redevin molecule de îndată ce se desprind din ea. Soluția intracelulară, așa cum rezultă din cercetările făcute, constă din apă și diferite substanțe hidrosolubile, are alcătuirea moleculară obișnuită, reprezintă materia nevie cuprinsă în viu și alcătuiește sediul obligatoriu al *b*. De reținut este constatarea legică după care *b* există numai în cadrul unității indisolubile cu soluția intracelulară, care, la rîndul ei, nu poate exista decît în prezența și în interacțiune cu *b*. Coexistența *b* și a soluției intracelulare constituie caracteristica și specificul protoplasmei vii, deosebită de protoplasma moartă, lipsită de *b*. Organismele vii se deosebesc între ele și după particularitățile *b*. Moartea protoplasmei începe cu procesul de destrămare a *b* și este însoțită întotdeauna de eliberare de energie; *b* este un sistem biologic, dinamic, în continuă dezvoltare, reprezentînd stadiul superior biologic al dezvoltării și existenței materiei" (8).

În „Mică enciclopedie de biologie și medicină", Victor Săhleanu și Bogdan Stugren, referindu-se la biostructură, arată că în concepția biostructurală „materia vie are structură supramoleculară, în care substanțele moleculare se integrează fără o modificare profundă și ireversibilă a structurii chimice proprii, dobîndind însă noi posibilități de manifestare (în concepția biochimismului român Eugen Macovschi). Protoplasma ar avea o structură *spongioasă*, conținînd materia vie (al cărei dinamism este *metabolismul*) și materia nevie (al cărei dinamism este *biochimismul*).

Biostructura — sistemul cvadridimensional — se destramă în momentul morții; orînduirea ei specifică echivalează cu o → engramă. Asimilația sau funcționarea duc la informații noi prin « codificarea aranjării spațiale reciproce a moleculelor», deoarece substanțele integrate capătă funcții « cibernetice » (de → autoreglare și → informație). Întrucît materia vie este un continuu, se înțelege cum o singură moleculă de substanță toxică, sau medicament, poate influența o celulă întreagă" (9).

b) În cele ce urmează vom menționa cîteva cazuri în care unele dicționare, nereferindu-se la termenul de *biostructură* sau la cel de *teorie biostructurală*, ci explicînd termenul *viață* de pe pozițiile materialismului dialectic, confirmă, prin descrierile pe care le fac, o serie de teze din teoria biostructurală. Astfel, în „Dicționarul enciclopedic român" se arată că „viața, sau mișcarea biologică" este „forma superioară de mișcare a materiei" și că „în ierarhia formelor de mișcare se plasează după mișcarea chimică". „Viața nu reprezintă însă o însumare a acestor procese [1], ci o sinteză a lor, o treaptă calitativ nouă și superioară față de mișcarea mecanică, fizică sau chimică, constituind o formă distinctă de mișcare a materiei, forma biologică" (10). Prin aceste precizări, dicționarul se apropie foarte mult de concepția biostructurală, care, izvorînd din materialismul dialectic, postulează că viața nu se rezumă la simpla formă chimică de mișcare a materiei și că *materia vie* este manifestarea concretă a unei *forme superioare de mișcare a materiei, distinctă* de *forma de mișcare chimică (moleculară)*, materia vie fiind constituită din *materia moleculară coexistentă* și din *materia biostructurată*, fenomenul de *viață* neputînd fi explicat numai prin formele fizico-chimice de mișcare. În continuare, în dicționarul citat se arată că „suportul material al vieții este materia vie, totalitatea substanțelor care alcătuiesc protoplasme" și că „apariția metabolismului este legată de o stare specială a substanțelor ..., care posedă însușirea de a se autostructura ..., precum și de a absorbi și de a fixa în structura sa unele molecule din mediu. În cursul evoluției, ea [2] a atins o treaptă la care gradul de complexitate al structurilor și al proceselor a făcut posibilă apariția unor forme superioare de mișcare : gîndirea, conștiința ..." (10). În ordinea ideilor expuse în citatul de mai sus se cuvine menționea că și teoria biostructurală concepe biostructura ca o rezultantă a unui îndelung proces de evoluție a materiei și ca o expresie specială, deosebită și extrem de complexă a structurilor și proceselor materiale. Cu privire la gîndire, teoria biostructurală postulează că aceasta este chiar o formă superioară de structurare, de mișcare și de manifestare a însești materiei biostructurate, materia gînditoare fiind definită în teoria biostructurală ca materie noesistructurată (noesis = gîndire).

Explicînd „viața", deși de pe pozițiile molecularismului, „Micul dicționar filozofic", apărut în anul 1973, se apropie prin unele formulări de teoria biostructurală, arătînd că „viața, formă de mișcare a materiei (sau mișcare biologică), așezată în ierarhia formelor de mișcare după mișcarea chimică" (viața este deci altceva decît simpla formă de mișcare moleculară a materiei), „... este expresia unor sisteme deschise plurimoleculare și eterogene, avînd formă exterioară și structură interioară caracteristice" (11).

[1] Mecanice, fizice, chimice.

[2] Materia.

Și mai pregnantă în legătură cu tezele teoriei biostructurale este explicarea termenului „viață" din „Micul dicționar de biologie", care, în anul 1976, arăta că „viața reprezintă o formă superioară de mișcare a materiei, mișcarea biologică (deosebită de mișcarea mecanică, fizică și chimică)" (12).

CONFIRMAREA STRUCTURII SPONGIOASE A MATERIEI VII

De la ipoteza cu privire la existența materiei vii sub forma sa biostructurată, enunțată pentru prima oară de academicianul Macovschi cu aproape trei decenii în urmă, s-a ajuns la certitudine științifică cu privire la această realitate.

În 1976, Keith R. Porter împreună cu J. J. Walosiewick, de la Universitatea Boulder din Colorado (S.U.A.), au descoperit, cu ajutorul unui microscop electronic de înaltă tensiune, că substanța fundamentală citoplasmatică are structură microreticulară, asemănătoare structurii trabeculare a oaselor spongioase, pe care au numit-o „rețea microtrabeculară" (13). Este *prima microfotografie electronică care confirmă existența biostructurii*. Față de obiecțiile că această „rețea" ar fi un artefact, în urma repetării experiențelor, imaginile au putut fi reobținute la microscop și prezentate fără echivoc. După cum au arătat autorii Keith R. Porter și Jonathan B. Tucker, în revista „Scientific American", în martie 1981 (14), această structură „pare că împarte celula în două faze : o fază reticulară polimerizată, bogată în proteine, și o fază lichidă, bogată în apă, care umple interstițiile (spațiile intratrabeculare). Este ceea ce susține, de mai bine de un sfert de veac, autorul teoriei biostructurii. Cercetările de microscopie electronică au confirmat premisele teoriei biostructurale despre structura spongioasă a materiei vii. Astfel, la fel cum la cîteva decenii după experiența crucială a lui Perrin cu privire la existența moleculelor acestea au fost fotografiate, grație progresului tehnic, tot așa la două decenii de la punerea bazelor teoriei biostructurale și la un deceniu de la experiența crucială care a confirmat valabilitatea ei, tot datorită progresului tehnic (al tehnicii microscopiei electronice), structura spongioasă microreticulară a materiei vii, adică tocmai partea care dovedește existența biostructurată a acesteia, a fost văzută și fotografiată.

În momentul trecerii sale neașteptate în neființă la începutul lunii aprilie 1985, marele savant pregătea pentru tipar o lucrre care să încununeze trei decenii de cercetări prodigioase care au fundamentat *concepția biostructurală asupra materiei vii*.

CONCLUZII

Toate cele menționate și o serie de alte „mărturii" teoretice sau practice legate de conceptul de biostructură creează certitudinea cu privire la forma de existență biostructurată a materiei în starea sa vie și, în consecință, conferă valabilitate științifică deplină concepției biostructurale.

De altfel, această certitudine este dată și de probitatea științifică ce caracterizează pe savant, autor al concepției, care, făcînd aprecieri asupra propriei sale opere, arăta în anul 1978 : „Teoria biostructurală este

o teorie tînără, aflată încă în stadiul de dezvoltare, și de aceea are o serie de aspecte ipotetice. Cercetările viitoare vor confirma pe unele din ele și vor impune modificarea și chiar abandonarea altora. Dar nu aceasta prezintă importanță. Important este că această teorie nouă constituie un punct de vedere calitativ deosebit de cel oferit de teoria moleculară a materiei vii și că apariția ei deschide un orizont științific nou și ridică probleme a căror rezolvare implică cercetări îndreptate spre noi obiective. Astfel, datorită teoriei biostructurale, începe un nou ciclu al gîndirii și al cercetării, aflat la un nivel superior ciclului actual, bazat pe teoria moleculară a materiei vii" (1.)

Faptul că concepția biostructurală a savantului român deschide noi orizonturi în știință este atestat de profesorul J. L. Destouche din Paris, care, în septembrie 1968, la Simpozionul internațional de epistemologie, filozofie și istorie a științelor de la Abbaye de Semanque (Franța), a spus : „Dumneavoastră ați depășit timpul. Teoria biostructurală nu este pentru secolul nostru. Ea aparține secolului următor" (15). Este încă un exemplu strălucit al aportului pe care savanții români îl aduc la progresul științei mondiale.

Prezentat la redacție
la 13 mai 1985

Centrul de calcul al industriei chimice
București, Splaiul Independenței nr. 202 A

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, *Teoria biostructurală și critica molecularismului contemporan*, în *Probleme actuale de biologie*, III, Edit. didactică și pedagogică, București, 1978.
2. I. Văduva-Poenaru, *Verificarea teoriei biostructurale* (convorbire cu academician E. Macovschi), în Magazin nr. 1203, București, 25 oct. 1980.
3. E. Niculescu-Mizil, *The Living Matter, Hierarchical Cybernetic System*, Rev. Roum. Biochim., **19**, *2*, (1982).
4. E. Macovschi, *Substratul material al gîndirii abstracte*, în *Sisteme în științele naturii*, Edit. Academiei, București, 1979.
5. V.M. INIUSHIN, *Bioplasma i izlucenia, Psihiceskaia samoreguleația*, Izd. mînvuza Kazahskoi SSR, Alma Ata, 1974.
6. E. Macovschi, *Priroda i structura jivoi materii*, Edit. Academiei, București, 1976.
7. N. Bodnariuc, *Biologie generală*, Edit. didactică și pedagogică, București, 1974.
8. A. POTLOG, V. VELICAN, *Dicționar practic de biologie agricolă*, Edit. enciclopedică, București, 1977.
9. V. SĂHLEANU, B. STUGREN, *Mică enciclopedie de biologie și medicină*, Edit. științifică și enciclopedică, București, 1970.
10. * * * *Dicționarul enciclopedic român*, Edit. politică, București, 1966.
11. * * * *Mic dicționar filozofic*, Edit. politică, București, 1973.
12. T. Crăciun, V. Crăciun, *Mic dicționar de biologie*, Edit. politică, București, 1976.
13. J.J. WALOSIEWICK, K.R. PORTER, *Stereo High-voltage Electronmicroscopy of whole cells of the human diploid line We* — 33. Amer. J. Anat., **147**, (3) 303, (1976).
14. K. R. PORTER, J. B. TUCKER, *The ground substance of the living cell*, Scientific American, **244**, (3), 57 (1981).
15. E. Macovschi, *Confirmarea teoriei biostructurale prin microscopia electronică de înaltă tensiune*, Edit. științifică și enciclopedică, București, 1981.

EFECTELE PLUMBULUI ȘI ARSENULUI ASUPRA ACTIVITĂȚII PIRUVATDEHIDROGENAZEI DIN CREIERUL DE ȘOBOLAN

ZOE ANCA, SILVIA GABOR

Rezumat. S-a studiat acțiunea diferitelor concentrații de plumb și arsen (0,2, 0,5 și 1 μM/50 mg țesut umed), administrate izolat și în combinație (1 : 1), asupra activității PD din creierul de șobolan tînăr.
Rezultatele obținute au arătat o semnificativă inhibiție a activității PD sub acțiunea plumbului și arsenului, inhibiția fiind dependentă de doză.
Administrarea simultană de arsen + plumb nu a dus la efecte aditive asupra activității PD. Activitatea PD din creierul de șobolan poate constitui un indicator relevant al interacțiunii plumbului și arsenului cu sistemul colinergic (furnizare de grupare acetil) și cu activitatea energetică a creierului.

Piruvatul este un intermediar cheie al metabolismului carbohidrat. Acest metabolit este generat în citosol din glucoză de către enzimele căii glicolitice (calea Embden-Meyerhof).

Metabolismul cerebral al piruvatului este calitativ similar cu cel din alte țesuturi, dar are o semnificație specială (fig. 1). Activitatea creierului depinde de oxidarea glucozei la piruvat și, spre deosebire de alte țesuturi, nu poate folosi acizi grași ca furnizor de energie (1).

Oxidarea deficitară a piruvatului duce la afectarea producției de acetil - CoA necesară în reacțiile biosintetice, la o acumulare a lactatului cu scăderea pH-ului și la o lipsă de ATP, urmare a afectării oxidării acestuia în ciclul Krebs și în lanțul transportorilor de electroni (2), (3).

Astfel, sinteza acetilcolinei și a altor neurotransmițători este extrem de sensibilă la afectarea metabolismului oxidativ al piruvatului (4).

Decarboxilarea oxidativă a piruvatului la CO_2 și acetil-CoA este catalizată de piruvatdehidrogenază (PD), complex enzimatic care necesită mulți factori pentru activitatea lui (acidul lipoic, CoA, TPP, NAD, FAD, Mg).

Avînd în vedere marea afinitate a Pb și As pentru grupările tiolactive ale multor enzime și proteine de structură (5), (6), (7), (8), se poate presupune că aceste elemente pot să își exercite acțiunea în creier, la nivelul sistemelor de reacție SH, incluzînd acidul lipoic, un component important al piruvatdehidrogenazei.

Prezentul studiu are ca scop să demonstreze acțiunea „in vitro" a diferitelor doze de plumb și arsen asupra activității piruvatdehidrogenazei în diferitele zone ale creierului de șobolan imatur.

MATERIAL ȘI METODE

Experimentul s-a efectuat pe șobolan în vîrstă de 5 săptămîni. Sacrificarea animalelor s-a făcut prin decapitare, creierul fiind rapid disecat, imersat în ser fiziologic răcit la —5°C și secționat pe zone : emisfere cerebrale, cerebel, trunchi cerebral. S-a pregătit un omogenat de creier 10% în soluție Krebs-Ringer în scopul determinării activității dehidrogenazice.
Piruvat de sodiu 11,36 mM s-a folosit ca substrat, iar trifeniltetrazolium clorat (TTC) în concentrație de 25 mg% ca acceptor de hidrogen.

Metoda se bazează pe reducerea enzimatică a TTC în prezența piruvatului ca substrat cu formare de trifenil-formozan solubil în solvenți organici (9).

Acetat de plumb 0,2, 0,5 și 1 μM și arsenit de sodiu au fost adăugate la 50 mg țesut umed, izolat și în combinație Pb + As = 1 : 1. La probele de control s-au folosit acetat de sodiu și clorură de sodiu în aceleași concentrații. S-au efectuat cîte 10 determinări pentru fiecare zonă din creier și doză de metal studiată.

Probele au fost incubate într-o atmosferă de O_2—CO_2 (95 % : 5 %) la 37°C într-un agitator metabolic pentru 60 min. După incubare, probele au fost centrifugate, iar sedimentul a fost suspendat în acetonă (2 ml/50 mg țesut umed). Extractul acetonic a fost colorimetrat la 493 nm în cuve de 1 cm. Valorile obținute au fost exprimate în mg TTC redus de 1 g țesut umed în 60 min.

Rezultatele finale au fost calculate statistic folosind media aritmetică ($\bar{x}$), textul de probabilitate (p) și modificările procentuale (%) față de animalele martor.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Activitatea piruvatdehidrogenazei din creier după tratament cu diferite concentrații de plumb și arsen este sumarizată în figura 2.

Rezultatele noastre au arătat că, sub acțiunea plumbului, activitatea PD a fost semnificativ scăzută în toate zonele din creier studiate, aceste modificări fiind dependente de doză (fig. 2, tabela 1).

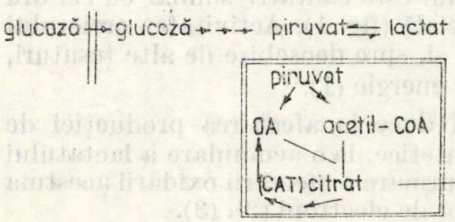


Fig. 1. — Metabolismul piruvatului în mitocondrie; OA = oxaloacetat; CAT = ciclul acizilor tricarboxilici; AG = acizi grași; ACh = acetilcolină.

Activitatea PD în cerebel la doza de 1 μM acetat de plumb/50 mg țesut umed a fost cea mai redusă în comparație cu activitatea din emisferele cerebrale și trunchiul cerebral.

Tabela 1

Activitatea piruvatdehidrogenazei din creierul de șobolan intoxicat cu plumb (mg tetrazoliu/g țesut umed/60 min)

Zona din creier		Pb (μM/50mg ț.u.)			
		Control	0,2	0,5	1,0
Emisfere	$\bar{x}$	0,77±0,050	0,492±0,009 p < 0,001 (27,4 %)	0,323±0,113 p < 0,001 (52,3 %)	0,158±0,016 0 < 0,001 (76,7 %)
		(10)	(10)	(10)	(10)
Cerebel	$\bar{x}$	0,648±0,097	0,426±0,083 p< 0,001 (34,3 %)	0,300±0,055 0 < 0,001 (53,7 %)	0,113±0,034 p < 0,001 (82,6 %)
		(10)	(10)	(10)	(10)
Trunchi	$\bar{x}$	0,496±0,035	0,324±0,035 p < 0,001 (31,1 %)	0,202±0,026 p < 0,001 (59,3 %)	0,152±0,008 p < 0,001 (69,4 %)
		(10)	(10)	(10)	(10)

Notă. În paranteză, numărul de determinări.

Rezultatele obținute cu privire la acțiunea „in vitro" a plumbului asupra activității PD din creier sînt în acord cu alte date experimentale care au evidențiat o inhibiție a respirației celulare și o creștere a sensibilității unor enzime NAD-dependente (2).

Tabela 2

Activitatea piruvatdehidrogenazei din creierul de șobolan intoxicat cu arsen (mg tetrazoliu/g țesut umed/60 min)

Zona din creier		As (μM/50 mg ț.u.)			
		Control	0,2	0,5	1,0
Emisfere	$\bar{x}$	0,760±0,045	0,544±0,041 $p < 0,001$ (28,5%)	0,457±0,022 $p < 0,001$ (40,0%)	0,260±0,070 $p < 0,001$ (75,0%)
		(10)	(10)	(10)	(10)
Cerebel	$\bar{x}$	0,716±0,076	0,451±0,056 $p < 0,001$ (37,1%)	0,323±0,029 $p < 0,001$ (54,9%)	0,217±0,039 $p < 0,001$ (69,7%)
		(10)	(10)	(10)	(10)
Trunchi	$\bar{x}$	0,490±0,040	0,470±0,027 $p < 0,1$ (4,1%)	0,352±0,031 $p < 0,001$ (28,2%)	0,254±0,059 $p < 0,001$ (48,2%)
		(10)	(10)	(10)	(10)

Notă. În paranteză, numărul de determinări.

Date experimentale cu privire la acțiunea toxică a arsenului au evidențiat interacțiunea acestuia cu activitatea dehidrogenazică în multe organe (6), (10), (11), exceptînd creierul.

Studiile noastre cu privire la acțiunea diferitelor concentrații de arsen asupra activității PD din creierul de șobolan imatur au evidențiat o inhibiție semnificativă în emisferele cerebrale și cerebel, efectele fiind dependente de doză (fig. 2, tabela 2). În trunchiul cerebral, activitatea Pb a fost inhibată semnificativ statistic numai la doza de 0,5 și 1 μM arsenit de sodiu/50 mg țesut umed.

Comparînd efectele As și Pb asupra activității PD, se observă (fig. 2) că Pb are un efect inhibitor mai pronunțat în toate zonele din creier și la toate dozele de Pb studiate. Aceste rezultate sînt în acord cu observațiile unor autori (12) care au semnalat faptul că acțiunea neurologică a metalelor este dată de afinitatea diferită a acestora pentru grupurile SH din diferite enzime. În acest sens s-ar putea ca rezultatele obținute de noi să indice diferențe în mecanismele de acțiune neurochimice ale Pb și As asupra unor enzime NAD-dependente.

Administrarea simultană de As + Pb (fig. 2, tabela 3) a scăzut semnificativ activitatea PD din creierul de șobolan în toate zonele studiate, scăderea fiind de asemenea dependentă de doză.

Este de subliniat faptul că, în cazul administrării asociate de Pb + As, scăderea activității PD nu este semnificativ mai mare decît în cazul administrării izolate a Pb, deci nu s-au observat efecte aditive ale celor două toxice. Probabil că Pb, avînd afinitate mai mare pentru grupările SH (12), ocupă toate locurile inhibitorii, iar As nu mai poate produce o inhibiție suplimentară.

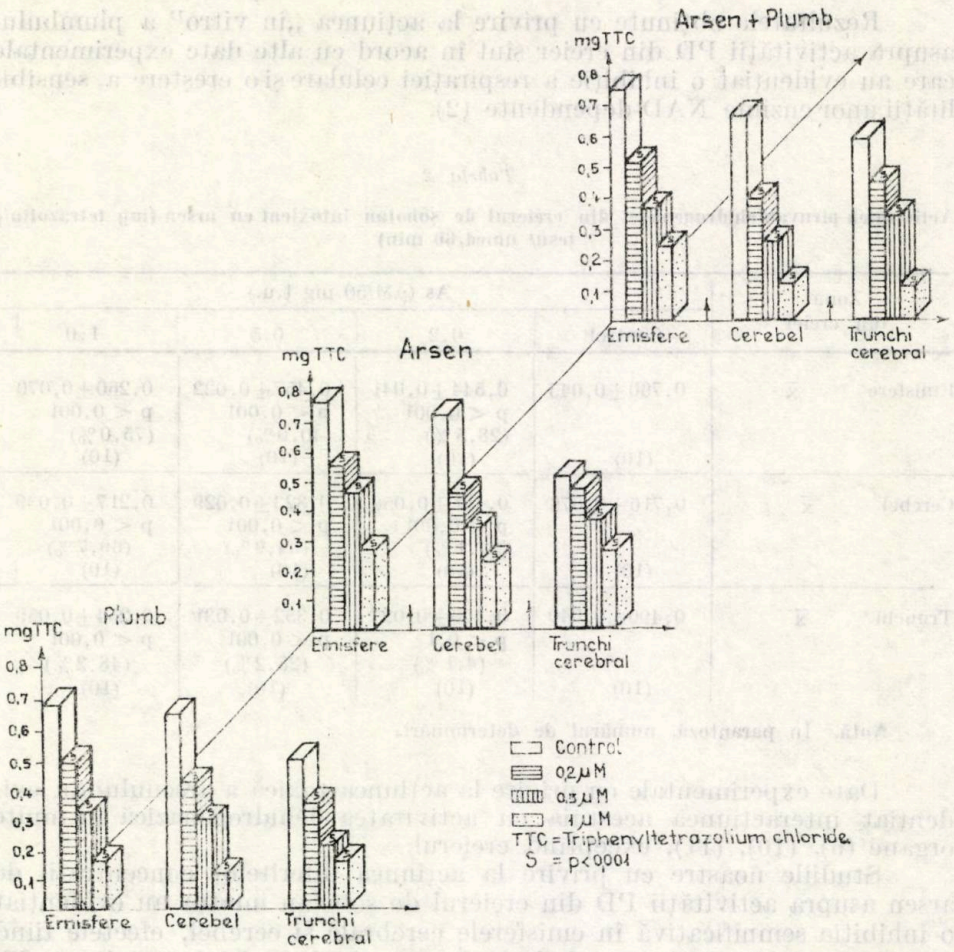


Fig. 2. — Activitatea piruvatdehidrogenazei din creierul de şobolan sub acţiunea diferitelor concentraţii de Pb, As, As + Pb. Graficul reprezintă media aritmetică a 10 determinări şi semnificaţia statistică ($S = p < 0{,}001$).

Tabela 3

Activitatea piruvatdehidrogenazei din creierul de şobolan intoxicat cu As + Pb (mg tetrazoliu/g ţesut umed/60 min)

Zona din creier		As + Pb (µM/50 mg ţ.u.)			
		Control	0,2	0,5	1,0
Emisfere	$\bar{x}$	0,749±0,49	0,510±0,027 p < 0,001 (31,9%)	0,363±0,040 p < 0,001 (51,6%)	0,240±0,024 p < 0,001 (68,0%)
		(10)	(10)	(10)	(10)
Cerebel	$\bar{x}$	0,660±0,056	0,387±0,024 p < 0,001 (41,4%)	0,250±0,030 p < 0,001 (62,2%)	0,113±0,004 p < 0,001 (82,2%)
		(10)	(10)	(10)	(10)
Trunchi	$\bar{x}$	0,578±0,061	0,434±0,018 p < 0,001 (25,0%)	0,322±0,065 p < 0,001 (44,3%)	0,113±0,028 p < 0,001 (80,5%)
		(10)	(10)	(10)	(10)

Notă. În paranteză, numărul de determinări.

Scăderea activității PD evidențiată de noi în creierul de șobolan imatur sub acțiunea „in vitro" a As și Pb poate constitui un indicator de interacțiune a acestor două toxice cu sistemul de neurotransmisie colinergic (furnizare de grupare acetil) și cu activitatea energetică a creierului.

Ne exprimăm mulțumirile noastre dr. G. Benga de la Facultatea de medicină și farmacie din Cluj-Napoca, în calitate de consultant științific.

Prezentat la redacție
la 23 aprilie 1985

Institutul de igienă și sănătate publică,
Cluj-Napoca, str. Pasteur nr. 6

LEAD AND ARSENIC EFFECTS ON PYRUVATE-DEHYDROGENASE ACTIVITY IN RAT BRAIN

Summary

In vitro action of different concentrations of lead acetate and natrium arsenite (0,2, 0,5 and 1 μM/50 mg wet tissue), solely and in combination (1 : 1) on PD activity in immature rat brain was studied.

The results, showed a significant inhibition of PD activity under lead and arsenic action, the inhibition being dose-dependent.

The simultaneous administration of arsenic and lead did not induce additive effects on the PD activity.

The PD activity in rat brain may be a relevant indicator of the interaction of lead and arsenic with the cholinergic system (acetyl-CoA groups supplier) and with the energizing activity of the brain.

BIBLIOGRAFIE

1. L. SOCOLOFF, J. Neurochem., **24**, 13(1977).
2. D. HOLTZMAN, J. S. HSU, P. NORTELL, Neurochem. Res., **3**, 195 (1978).
3. D. E. GMEREK, M. R. McCAFFERTY, K. J. O'NEILL, B. R. MELAMED, J. J. O'NEILL, J. Neurochem., **36**, 1109(1981).
4. J. P. BLASS, Neurology, **29**, 280 (1979).
5. B. L. VALLE, *Air Quality Monographs, Arsenic*, American Petr. Inst., Washington, 1973, p. 73.
6. Z. ANCA, S. GABOR, Rev. Roum. Biochem., **18**, 237 (1981).
7. J. ESINGER, Quart. Rev. Biophys., II, **46**, 437(1978).
8. K. NAKAGAWA, M. ASAMI, K. KURIANA, Toxicol. Appl. Pharmacol., **56**, 86 (1980).
9. L. MESROBEANU, E. PAPAZIN, N. MITRICĂ, Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., **16**, 387 (1957).
10. C. M. SCHILLER, B. A. EOWLER, J. S. WOODS, Chem. Biol. Interaction, **22**, 25 (1978).
11. V. BENKO, P. RÖSSNER, M. MOKRY, J. Hyg. Epidemiol. Immunol., **19**, 17 (1975).
12. R. G. FELDMAN, Occupat. Neurol., Acta Neurol. Scand., Suppl. 92, **66**, 143 (1982).

CARACTERISTICI ALE MUTANTEI ALBE DE *CYNARA SCOLYMUS* L.
I. DINAMICA POLIFENOLILOR ŞI FLAVONELOR

I. I. BĂRA, ELVIRA GILLE, T. POPESCU, A. MIHALEA *

Rezumat. Mutanta albă de *Cynara scolymus* L. se deosebeşte prin trăsături morfologice (forma frunzelor, dimensiunile spinilor de pe marginea limbului foliar, forma şi dimensiunile solzilor capitulului) de plantele normale, cu floare violacee. Sub aspectul conţinutului în polifenoli şi flavone, plantele mutante s-au încadrat în limitele de variabilitate înregistrate pentru populaţia luată în studiu.

Specie originară din sudul Spaniei, *Cynara scolymus* L. şi-a cucerit un binemeritat loc în preocupările fitofarmaceutice româneşti (1,) (2), (3), (4). Interesul pentru cunoaşterea biologiei, pentru selecţia şi ameliorarea acestei specii este în creştere (5).

Scopul prezentelor investigaţii a fost obţinerea de plante modificate, perpetuarea şi analizarea lor sub aspectul comportamentului biochimic.

MATERIAL ŞI METODE DE LUCRU

Un număr de 450 de seminţe, provenite de la SCPMA-Fundulea, recolta anului 1980, au fost supuse tratamentului cu ultrasunete timp de trei ore (energie maximă la frecvenţa de 1 MHz), după care au fost introduse în sol (primăvara anului 1981).

Conţinutul în polifenoli şi flavone a fost determinat prin metoda fotocolorimetrică cu reactiv Arnow şi triclorură de aluminiu. Curbele etalon s-au stabilit cu cinarină pentru polifenoli şi rutozid pentru flavone.

Media rezultatelor analizelor (acolo unde numărul de probe investigate a fost suficient) s-a stabilit prin calcule statistice.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din cele 450 de seminţe tratate cu ultrasunete, au răsărit 400 de plante. Deşi planta este bianuală, în primul an de vegetaţie au înflorit patru. Toate au avut flori albe. Menţionăm că experimentul a fost efectuat în anii 1981—1983 în cîmpul experimental al Staţiunii „Stejarul" din Piatra Neamţ.

Întrucît însă plante cu floare albă au fost identificate şi în cîmpul experimental al SCPMA-Fundulea fără administrarea vreunui tratament şi se cunosc şi indicaţii bibliografice în care se fac referiri la plante cu astfel

Tabela 1

Dinamica conţinutului în polifenoli şi flavone la plante normale şi mutante de *Cynara*

Planta		Anul 1981		Anul 1982
		polifenoli, % (în cinarină)	flavone, % (în rutozid)	polifenoli, % (în cinarină)
Cu flori albe :	— frunze bazale	1,65—2,50	0,88—1,03	descendenţă albă 1,15—1,10
				descendenţă violacee 1,15—0,98
	— frunze vîrf	2,35—3,50	0,74—0,60	descendenţă albă 1,00—1,65
				descendenţă violacee 1,00—0,85
Normală (martor) :	— înflorită	2,50	1,14	1,00
	— neînflorită	3,10	0,81	
Normală tratată		2,24—1,94	0,80—0,85	

St. cerc. biochim., 28, 2, 130—132 (1985)

de flori (6), (7), nu putem afirma că respectiva mutantă a apărut sub influența ultrasunetelor.

Plantele menționate, cu caracter mutant, prezentau tulpini mai puțin viguroase decît cele normale, erau mai slab ramificate (una dintre ele a fost complet neramificată), cu înălțimi variind între 1,30 și 1,70 m, cu frunzele mai puțin divizate, rugoase și albicioase (pe ambele fețe), avînd spinii de pe marginea limbului foliar mai mici și mai rari. Florile, dispuse în capitule de mărimi similare celor de la plantele normale, erau de culoare albă, uneori alb-gălbuie sau albă cu tentă violacee la bază. Solzii capitulului erau mai scurți și mai scurt acuminați decît la plantele normale. Organoleptic nu s-au constatat deosebiri între cele două tipuri de plante, în sensul că nu s-au decelat diferențe de miros, iar insectele vizitau în mod egal atît florile albe cît și pe cele violacee.

Lăsate la libera polenizare, în condițiile în care alături se aflau plante normale din cadrul altui experiment, cele patru plante mutante au produs 48 de semințe.

În anul 1982, toate cele 48 de semințe au germinat. Una dintre plăntuțele rezultate avea cotiledoanele albinotice, dar a dispărut sub atacul masiv al afidelor (a fost atacată numai aceasta în primele zile de vegetație). Din restul de 47 de plante rămase, în 1982 au înflorit cinci — două au avut flori albe și trei flori violacee. Înflorirea s-a declanșat, în condițiile de la Piatra Neamț, între 7.IX și 23.IX 1982. Plantele normale (martor), în aceleași condiții, au avut perioada de înflorire între 11.IX și 27.IX.1982. În acest an însă, nu s-a obținut nici o sămînță viabilă (de la nici una dintre cele cinci plante). În 1983, din totalul de 47 de plante (inclusiv cele cinci care au înflorit în 1982), au pornit în vegetație doar 11 (celelalte au pierit în timpul iernii), dintre care au înflorit numai trei. Din totalitatea semințelor recoltate, în 1984, în condițiile cîmpului de la SCPMA-Fundulea, au răsărit doar 18 plante. Dintre acestea a înflorit doar una, care a fost de culoare violacee.

Analizele pentru stabilirea conținutului de polifenoli și flavone au relevat următoarele (tabela 1):

În 1981, plantele cu flori albe au avut, în medie, un conținut de 2,5% polifenoli (amplitudinea de variabilitate cuprinsă între 1,65 și 3,50%) și 0,81% flavone (cu amplitudinea cuprinsă între 0,60 și 1,03%). În aceleași

scolymus L.

Anul 1983			Anul 1984	
Flavone, % (în rutozid)	polifenoli, % (în cinarină)	flavone, % (în rutozid)	polifenoli, % (în cinarină)	flavone, % (în rutozid)
0,42—0,24	2,80	0,70	$\bar{x}$ = 1,90(0,50—3,50)	$\bar{x}$ = 0,61(0,30—0,91)
0,36—0,32	2,00—3,70	0,58—0,76		
0,48—0,59				
0,39—0,53				
0,34	1,70—1,96	1,04—1,98	$\bar{x}$ = 2,65(1,30—3,00)	$\bar{x}$ = 0,27(0,11—0,55)

condiții, plantele martor au avut 2,80% polifenoli și 0,97% flavone. Plante din lotul tratat cu ultrasunete, dar care nu au înflorit, au avut între 1,94 și 2,24% polifenoli și 0,80% pînă la 0,85% flavone. În anii următori, descendența plantelor cu flori albe a înregistrat o scădere a conținutului de polifenoli și flavone în 1982 și o creștere în 1983 (reamintim că este vorba despre aceeași descendență, nu de alte plante rezultate dintr-o altă generație de semințe). Interesant este faptul că și martorul a avut aceeași comportare în cei doi ani consecutivi.

Începînd cu anul 1984, în cîmpul SCPMA-Fundulea, cei 18 descendenți ai plantelor cu flori albe s-au comportat cu un grad mai mare de variabilitate. În primul rînd, înflorirea nu s-a produs decît la una dintre plante, fără a forma însă semințe. Media conținutului în polifenoli a fost de 1,90% (limitele de variabilitate fiind 0,50 și 3,50%), iar a celui de flavone de 0,61% (între 0,30% și 0,91%). Martorul a înregistrat în aceleași condiții 2,65% polifenoli (între 1,30 și 3,00%) și 0,27% flavone (între 0,11 și 0,55%).

CONCLUZII

În 1981 s-a identificat și izolat o mutantă albă de *Cynara scolymus* L. în cîmpul experimental al Stațiunii „Stejarul" din Piatra Neamț.

Supusă analizelor biochimice pe o perioadă de patru ani, descendența a etalat indivizi cu productivitate ridicată în polifenoli și flavone, variabilitatea individuală înscriindu-se în limitele amplitudinii normale a speciei (polifenolii au avut valori cuprinse între 1 și 3,50%, iar flavonele între 0,24 și 1,03%). Productivitatea medie a indivizilor mutanți a fost superioară martorului pe întreaga durată a experimentului.

Prezentat la redacție
la 6 februarie 1985

*Stațiunea de cercetări „Stejarul",
Piatra Neamț, str. Alexandru cel Bun nr. 6
și
*Stațiunea de cercetări
pentru plante medicinale și aromatice
Fundulea, jud. Călărași*

THE FEATURES OF WHITE *CYNARA SCOLYMUS* L. MUTANT. I. THE DYNAMICS OF POLYPHENOLS AND FLAVONES

Summary

The *Cynara scolymus* L. individuals with white flowers differ by morphological features (the shape and colour of leaves, the shape and size of thorns) from the normal type. The productivity was higher than in normal plants, being comprised between 1% and 3,50% for polyphenols and between 0.24% and 1.03% for flavones.

BIBLIOGRAFIE

1. O. BOJOR, M. ALEXAN, *Plantele medicinale — izvor de sănătate*, Edit. Ceres, București, 1981.
2. C. CONSTANTINESCU, *Plantele medicinale în apărarea sănătății*, Edit. Centrocoop, București, 1967.
3. D. GR. CONSTANTINESCU, E. M. HAȚIEGANU, *Plantele medicinale. Proprietățile lor terapeutice și modul de folosire*, Edit. medicală, București, 1979.
4. * * * *Farmacopeea Română*, ed. a IX-a Edit. medicală, București, 1976.
5. I. I. BĂRA, G. GHIORGHIȚĂ, în Lucrările celui de-al II-lea Simpozion de genetică, Piatra Neamț, 11—12, 1979.
6. C. FOURY, Ann. Amelior. Plant., Paris, **27**/4, 411—426 (1977).
7. C. FOURY, S. AUBERT, Ann. Amelior. Plant., Paris, **27**/5, 603—612 (1977).

PROCEDEU SIMPLIFICAT DE PREPARARE A LIZOZIMULUI DIN ALBUȘ DE OU

LIGIA MATEI

Rezumat. Purificarea lizozimului din albuș de ou de găină se poate realiza într-o singură etapă, prin gel-filtrarea albușului pe o coloană umplută cu Sepharose 6B. Cromatografia pe Sepharose 6B s-a folosit și pentru simplificarea fazei de purificare a lizozimului, în procedeul de preparare a acestuia, conducînd și la o creștere a randamentului. Puritatea enzimei a fost testată prin PAA disc-electroforeză în mediu acid.

Lizozimul (N-acetilmuramilhidrolaza, E.C.3.2.1.17) din albuș de ou de găină se prepară relativ ușor, prin precipitarea directă a albușului tamponat la pH 9,5 cu 5% NaCl (1), urmată de recristalizări repetate.

Pentru obținerea unor preparate pure de lizozim sînt însă necesare cel puțin o cromatografie de schimb ionic și o gel-filtrare. Metodele de preparare indicate de diferiți autori (2), (3) cuprind patru etape principale, și anume: obținerea unui extract îmbogățit în lizozim, prin adsorbție pe Amberlite CG—50; cromatografie pe CM-celuloză sau precipitare cu sulfat de amoniu; gel-filtrare pe Sephadex G_{25}; cromatografie de echilibrare pe Amberlite CG—50.

Fernández-Sousa și Rodriguez (4) au observat că, prin gel-filtrarea lizozimului pe o coloană cu ultrogel AcA 54, acesta eluează dincolo de volumul total al coloanei, iar prin cromatografie pe biogel A 0,5 m volumul de eluție al enzimei este și mai mare. Bazîndu-se pe aceste observații, ei au reușit să purifice această proteină prin trecerea albușului de ou pe o coloană umplută cu biogel A 0,5 m (5).

În prezenta lucrare s-a urmărit purificarea lizozimului folosind gelul de Sepharose 6B și introducerea cromatografiei pe Sepharose 6B ca etapă de purificare în procedeul de preparare a lizozimului din albuș de ou de găină.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat cu ouă de găină proaspete (pH albuș aproximativ 8,5) procurate din comerț.

S-au folosit următoarele materiale: Sepharose 6B și Sephadex G_{25} (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden); Amberlite CG—50 II (Serva, R. F. Germania); lizozim din albuș de ou de găină (NBCo, S.U.A.), cu activitate litică de 10 000 U/mg; albumină serică bovină (Sigma Chemical Co., S.U.A.); celule bacteriene de *Micrococcus lysodeikticus*, tulpina NCTC, livrate de Institutul „Dr. I. Cantacuzino", București.

Reactivii întrebuințați au fost de puritate p.a.

Cromatografia albușului de ou pe Sepharose 6B: 5 ml albuș de ou s-au diluat cu tampon fosfat 0,05 M, pH 6,3 (raport albuș : tampon = 1 : 3) (5) și s-au aplicat pe o coloană umplută cu Sepharose 6B (2,2 × 100 cm). Același tampon a fost folosit pentru echilibrarea și eluarea coloanei.

Precipitarea ovomucinei s-a realizat prin diluarea albușului de ou cu apă distilată (raport albuș : apă = 1 : 4) (6) și centrifugarea la 4 000 rot/min, timp de 15 min, a precipitatului format.

Cromatografia de schimb ionic pe Amberlite CG-50. Rășina schimbătoare de ioni a fost prelucrată după Huisman, citat de Gheție (7), și echilibrată cu tampon fosfat 0,2 M, pH 6,5. Supernatantul obținut la precipitarea ovomucinei a fost adus la pH 4,5 cu acid acetic 10% și

St. cerc. biochim., 28, 2, 133—140 (1985)

amestecat timp de 4 ore, la 4°C, cu rășina (20 ml Amberlite pentru 100 ml albuș de ou luat în lucru). S-a lăsat peste noapte la 4°C, după care s-a spălat cu apă distilată și s-a eluat cu tampon fosfat 0,8 M, pH 6,5.

Gel-filtrarea pe Sephadex G_{25} pentru desalifierea extractului îmbogățit în lizozim obținut la desorbția de pe Amberlite s-a efectuat pe o coloană de 2,6 × 27 cm, în porțiuni de cîte 30 ml probă; viteza coloanei = 30 ml/oră.

Determinarea lizozimului s-a efectuat prin măsurarea activității litice față de *Micrococcus lysodeikticus*, folosind metoda „plăcii" r(8). Suspensia bacteriană (E_{450nm} = 1,4) a fost inclusă, în proporție de 1,5 : 10, în gelul de agar 1 % (Difco). S-a folosit tampon fosfat 0,05 M, pH 6,3, cu adaos de 0,1 M NaCl.

Determinarea proteinelor s-a făcut prin metoda Lowry (9).

Determinarea fosfaților în eluatul de la cromatografia pe Sephadex G_{25} s-a efectuat prin precipitare cu reactiv fosfomolibdenic (10).

Disc-electroforeza în PAA la pH acid, pentru evidențierea omogenității lizozimului, s-a realizat, după Reisfeld și colab. (11), în tampon alanină, pH 4,5, timp de migrare 2 ore și 30 min, folosind 40 μg proteină/tub.

Concentrarea lizozimului s-a efectuat prin ultrafiltrare pe Amicon, membrana UM_2.

Liofilizarea lizozimului s-a realizat la microsublimatorul Usifroid, tip MSP 32/4.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin cromatografia albușului de ou pe o coloană umplută cu Sepharose 6B, în condițiile descrise, se observă că una din componentele proteice ale albușului, și anume lizozimul, eluează mai tîrziu decît ar fi de așteptat conform greutății sale moleculare (14 300). Lizozimul apare mult după volumul total al coloanei (fig. 1).

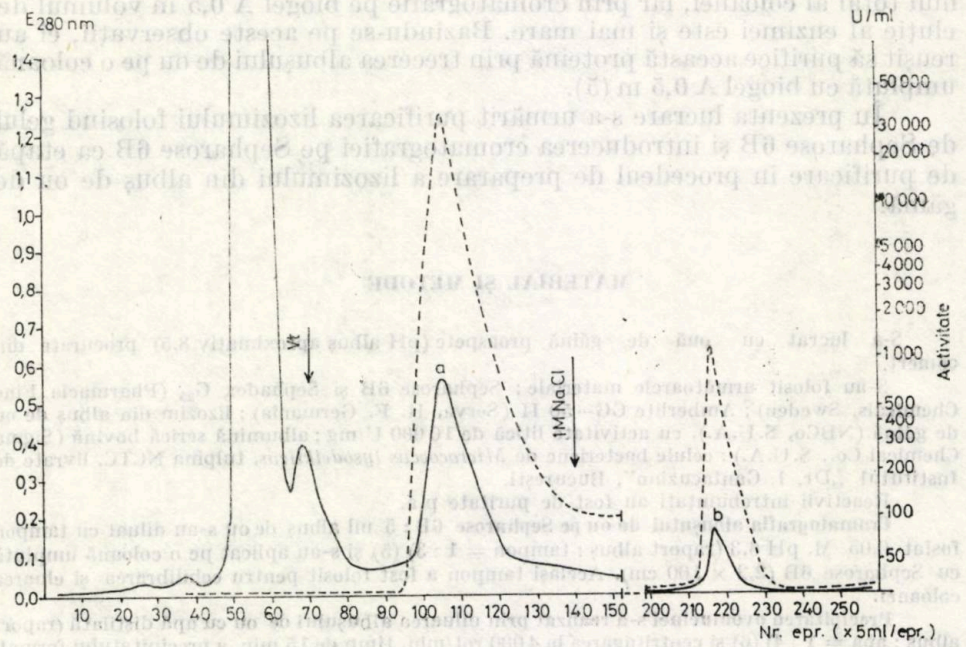


Fig. 1. — Cromatografia pe coloană de Sepharose 6B (2,2 × 100 cm) a albușului de ou diluat 1 : 3 cu tampon fosfat 0,05 M, pH 6,3.

——— E_{280}

- - - - - - - - - activitate litică

S-a lucrat cu coloane de diferite dimensiuni și s-a observat că între volumul de eluție al lizozimului și volumul total al coloanei există relația : $V_e = V_t + 0{,}5\ V_t$.

Tamponul fosfat 0,05 M, pH 6,3 (I = 0,07), întrebuințat la eluarea coloanei, constituie de fapt condițiile de pH și tărie ionică optime pentru acțiunea lizozimului asupra peretelui celulei bacteriene *Micrococcus lysodeikticus* (12).

Prin modificarea tăriei ionice a tamponului de eluție, de exemplu tampon fosfat 0,05 M, pH 6,3, conținînd 0,3 M NaCl (I = 0,35), fenomenul de întîrziere a eluției nu mai are loc. Această comportare anormală a lizozimului se datorează unei interacțiuni specifice a enzimei cu gelul de agaroză și aceasta probabil datorită asemănării structurale a agarozei cu polizaharidul peretelui celulei bacteriene (fig. 2) (4).

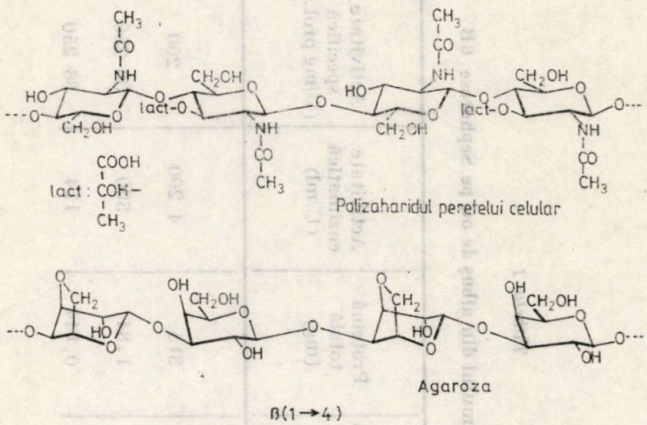


Fig. 2. — Fragmente din structura polizaharidului peretelui celulei bacteriene și a matricei de agaroză.

Fernández-Sousa și colab. (5) au obținut o recuperare de 100% a enzimei introduse în coloană prin eluare cu tampon 0,05 M, pH 6,3. În cazul nostru, recuperarea este de numai 91% în piscul principal „a" (tabela 1) ; diferența de 9% reprezintă lizozimul reținut de matricea gelului și care poate fi eluat ulterior, într-un pisc secundar „b", cu tampon fosfat 0,05 M, pH 6,3, conținînd 1 M NaCl (I = 1,1). Datorită interacțiunii mai puternice a enzimei cu gelul de Sepharose, volumul de eluție corespunzător piscului „a" este mai mare decît în cazul cromatografiei pe biogel A 0,5 m.

Este de așteptat ca enzima să elueze singură, celelalte proteine ale albușului eluînd înainte de V_t. Omogenitatea proteinei a fost verificată prin disc-electroforeză în mediu acid (fig. 3).

Prin această metodă se realizează o purificare a lizozimului de 181 de ori, activitatea specifică a enzimei fiind ridicată (36 250 U/mg).

Datorită concentrațiilor mici obținute, această metodă nu poate constitui un procedeu de preparare a lizozimului, dar poate fi folosită pentru simplificarea fazei de purificare a acestuia în oricare din procedeele de preparare cunoscute.

Tabela 1

Purificarea lizozimului din albuș de ou pe Sepharose 6B

Nr. crt.	Denumirea	Volum (ml)	Concentrația proteică (mg/ml)	Proteină totală (mg)	Activitate enzimatică (U/ml)	Activitate specifică (U/mg prot.)	Activitate totală (U)	Factor de purificare	Randament (%)
1	Albuș de ou diluat 1 : 3 cu tampon	15	21	315	4 200	200	63 000	1	100
2	Pisc principal „a”	115	0,016	1,84	500	36 250	57 500	181	91
3	Pisc secundar „b”	48	0,003	0,144	114	36 250	5 500	181	9

Etapele de preparare a lizozimului prin acest procedeu simplificat sînt următoarele :

1) precipitarea ovomucinei, prin diluarea 1 : 5 a albușului de ou, cu apă distilată ;

2) obținerea extractului îmbogățit în lizozim, prin adsorbția pe Amberlite CG—50 II a albușului diluat și eluarea coloanei cu tampon fosfat 0,8 M, pH 6,5 (fig. 4) ;

3) desalifierea prin gel-filtrare pe o coloană cu Sephadex G_{25} a extractului obținut în etapa anterioară ;

4) purificarea lizozimului prin cromatografierea pe Sepharose 6B a extractului desalifiat (fig. 5).

În continuare, produsul a fost concentrat prin ultrafiltrare pe Amicon UM_2 și liofilizat. S-au obținut 530 mg lizozim liofilizat, cu activitate enzimatică de 1 800 U/mg.

Lizozimul obținut prin acest procedeu este de puritate avansată, comparabilă cu cea a preparatelor comerciale (Serva, Schuchardt, Calbiochem) (fig. 3). Randamentul metodei este superior altor metode indicate de literatură, și anume 63% (pînă la faza de concentrare) față de 40% (2), (3).

Activitatea specifică a enzimei, factorul de purificare și randamentul, corespunzătoare fiecărei etape de obținere, sînt prezentate în tabela 2.

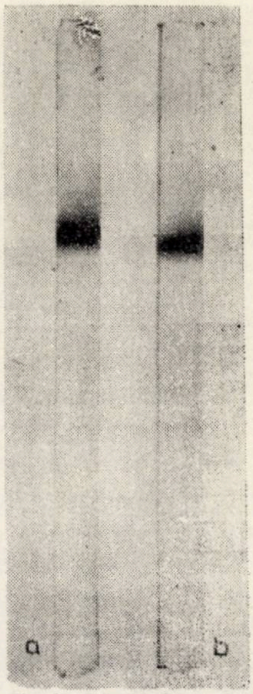


Fig. 3. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă, la pH 4,5 a lizozimului (40 μg/tub) : *a*, lizozim etalon (Serva) ; *b*, lizozim purificat pe Sepharose 6B.

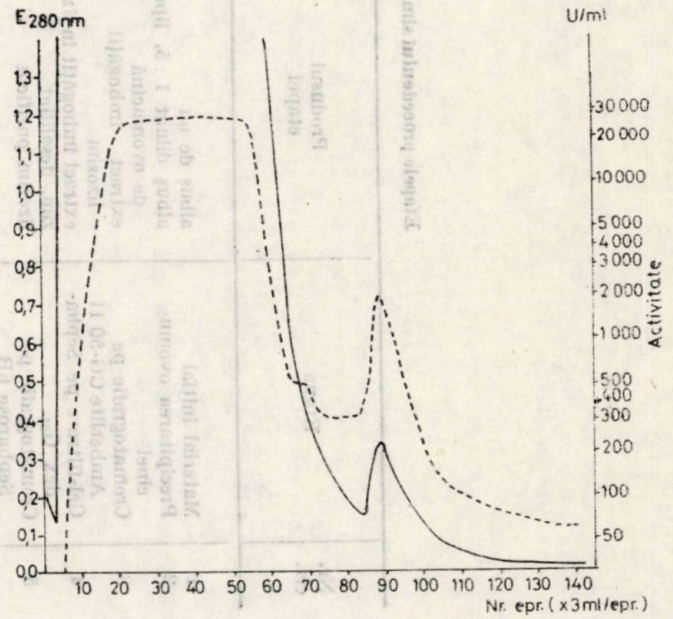


Fig. 4. — Cromatografia albușului de ou pe Amberlite CG-50 II. Eluare cu tampon fosfat 0,8 M, pH 6,5.
———— E_{280mm}
— — — — activitate litică

Tabela 2

Etapele procedeului simplificat de preparare a lizozimului din albuş de ou

Nr. crt.	Etapa	Produsul etapei	Volum (ml)	Conc. prot. (mg/ml)	Proteină totală (mg)	Activ. enzim. (U/ml)	Activ. specifică U/mg prot.)	Activ. totală ($U \times 10^{-3}$)	Randamentul etapei (%)
1	Material iniţial	albuş de ou	100	83	8 300	21 000	253	2100	—
2	Precipitarea ovomucinei	albuş diluat 1 : 5, lipsit de ovomucină	490	14,9	7 300	3 900	239	1 911	91
3	Cromatografie pe Amberlite CG-50 II	extract îmbogăţit în lizozim	120	2,31	277	15 000	6 493	1 800	94
4	Gel-filtrare pe Sephadex G_{25}	extract îmbogăţit în lizozim, desalifiat	220	1,04	230	6 800	6 538	1 496	83
5	Cromatografie pe Sepharose 6B	lizozim purificat	430	0,3	130	3 100	10 333	1 333	89
6	Concentrare pe Amicon	lizozim purificat şi concentrat	86	1,2	103	11 000	9 167	946	71
7	Liofilizare	lizozim pur, liofilizat	—	—	103	—	9 167	946	100

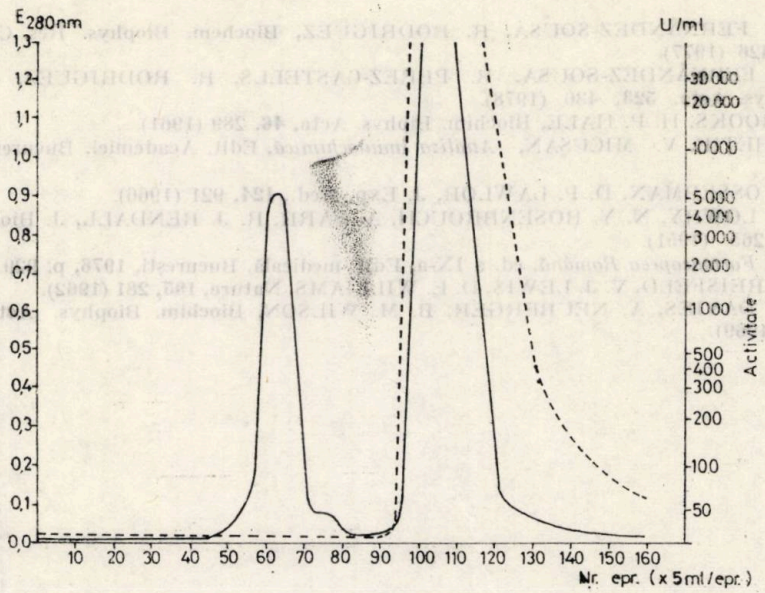


Fig. 5. — Cromatografia pe coloană de Sepharose 6B (2,2 × 100 cm) a extractului îmbogățit în lizozim. Volum probă = 50 ml ; viteza coloanei = 30 ml/oră ; eluare cu tampon fosfat 0,05 M, pH 6,5.
——E_{280} — — — — — activitate litică.

În concluzie, se poate considera că, datorită interacțiunii specifice a lizozimului cu matricea de agaroză a gelurilor folosite la gel-filtrare, acestea constituie materiale excelente pentru realizarea simplă și eficientă a purificării acestei enzime.

Prezentat la redacție
la 4 iunie 1985

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
București, Splaiul Independenței, nr. 296

SIMPLIFIED PROCEDURE FOR HEN EGG-WHITE LYSOZYME PREPARATION

Summary

Purification of hen egg-white lysozyme was performed, in a single step, by egg-white gel filtration on Sepharose 6B column.

Sepharose 6B chromatography was also used for simplification of the purification step in lysozyme preparation, resulting in increased yield.

Homogeneity of enzyme was tested by PAA gel electrophoresis.

BIBLIOGRAFIE

1. G. ALDERTON, H. L. FAVOLD, J. Biol. Chem., **164**, 1 (1946).
2. J. JOLLÈS, G. SPOTORNO, P. JOLLÈS, Nature, **208**, 5016 (1965).
3. A. C. DIANOUX, P. JOLLÈS, Biochim. Biophys. Acta, **133**, 472 (1967).

4. J. M. FERNÁNDEZ-SOUSA, R. RODRIGUEZ, Biochem. Biophys. Res. Commun., **74**, 1426 (1977).
5. J. M. FERNÁNDEZ-SOUSA, R. PEREZ-CASTELLS, R. RODRIGUEZ, Biochim. Biophys. Acta, **523**, 430 (1978).
6. J. BROOKS, H. P. HALE, Biochim. Biphys. Acta, **46**, 289 (1961).
7. V. GHEȚIE, V. MICUȘAN, *Analiza imunochimică*, Edit. Academiei, București, 1966, p. 67.
8. E. F. OSSERMAN, D. P. LAWLOR, J. Exp. Med., **124**, 921 (1966).
9. O. H. LOWRY, N. Y. ROSENBROUCH, A. FARR, R. J. RENDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
10. * * * *Farmacopeea Română*, ed. a IX-a, Edit. medicală, București, 1976, p. 929.
11. R. A. REISFELD, V. J. LEWIS, D. E. WILLIAMS, Nature, **195**, 281 (1962).
12. R. C. DAVIES, A. NEUBERGER, B. M. WILSON, Biochim. Biophys. Acta, **178**, 293 (1969).

CERCETĂRI BIOCHIMICE ASUPRA CAROTENOIDELOR DIN PORUMB. IV. MODIFICAREA CONȚINUTULUI CAROTENOIDELOR ȘI AL UNOR ELEMENTE MINERALE (N, K, P, Na, Ca, Mg) DIN BOABELE UNOR HIBRIZI DE PORUMB DIPLOID ȘI OPAQUE-2, ÎN TIMPUL PĂSTRĂRII ACESTORA

G. NEAMȚU *, I. CĂBULEA **, AUGUSTA LUJERDEAN *, FL. IRIMIE ***

Rezumat. S-au determinat conținutul pigmenților carotenoidici, pe tipuri de carotenoide, și conținutul unor elemente minerale (N, K, P, Na, Ca, Mg) din boabele a 20 de hibrizi de porumb diploid și din 20 de hibrizi opaque-2, în anul de obținere a hibrizilor și după o perioadă de păstrare a boabelor acestor hibrizi de patru și, respectiv, doi ani.
În timpul păstrării boabelor de porumb se produce o micșorare semnificativă a conținutului carotenoidelor și a conținutului unor elemente minerale (azot, fosfor), datorită probabil proceselor biochimice catabolice care au loc în embrionii și în endospermul boabelor de porumb, precum și influenței factorilor de mediu (O_2, CO_2, H_2O, lumină etc.). Micșorarea conținutului carotenoidelor la ambele categorii de porumb se produce în următoarea ordine descrescîndă: carotenoide hidrocarburice, criptoxantine, zeaxantină, luteină, epoxizi carotenoidici.

Din cercetările noastre anterioare asupra carotenoidelor din porumb a reieșit că, în boabele diferitelor feluri de porumb (diploid, opaque-2, dihaploid), se găsesc un număr mare de carotenoide cu un conținut total relativ ridicat (1), (2), (3), (4). Porumbul face parte dintre puținele plante de cultură care au în semințe un conținut ridicat și variat de carotenoide (5), (6). Sub aspectul structurii moleculare a carotenoidelor, în boabele de porumb predomină, atît calitativ cît și cantitativ, pigmenții carotenoidici C_{40} cu structură biciclică (α- și β-iononică), alături de care se găsesc un număr redus de carotenoide cu structură monociclică și, respectiv, aciclică (7), (8).

Pigmenții carotenoidici constituie indici calitativi importanți ai boabelor de porumb, care le determină culoarea și contribuie totodată la creșterea valorii biologice a porumbului în alimentația oamenilor și în furajarea animalelor. Carotenoidele provitaminice din boabele de porumb constituie o sursă importantă din care omul și animalele își sintetizează vitamina A.

Întrucît boabele de porumb, datorită structurii și compoziției lor, pot fi păstrate un timp mai îndelungat ca rezerve alimentare, este important a se cunoaște în ce măsură se produce degradarea carotenoidelor și a unor elemente minerale din boabele de porumb, în timpul păstrării acestora.

În această lucrare se prezintă conținutul mediu al pigmenților carotenoidici și al unor elemente minerale (N, K, P, Na, Ca, Mg) din boabele a 20 de hibrizi de porumb diploizi, obținuți în 1980, și din 20 de hibrizi de porumb opaque-2, obținuți în 1982. Determinarea conținutului carotenoidelor și a elementelor minerale cercetate s-a făcut în anii obținerii hibrizilor de porumb și în anul 1984, după o perioadă de patru și, respectiv, doi ani de păstrare a boabelor de porumb.

St. cerc. biochim., 28, 2, 141–146 (1985)

MATERIAL ŞI METODĂ

Materialul biologic s-a procurat de la S.C.A. Turda, fiind obţinut de un colectiv de cercetători condus de dr. ing. I.Căbulea. După recoltare şi sortarea ştiuleţilor, porumbul s-a desfăcut, s-a uscat la umbră, în strat subţire, pînă la umiditatea de 13,5—14%. Boabele diferiţilor hibrizi de porumb diploizi şi opaque-2 s-au pus în pungi de hîrtie, care s-au depozitat într-o cameră aerisită, cu temperatură constantă de 14—15°C, la întuneric şi umiditate redusă.

Determinarea conţinutului pigmenţilor carotenoidici s-a făcut pe grupe de carotenoide (carotenoide hidrocarburice, criptoxantine, epoxizi carotenoidici), pentru a se evita pierderile în timpul separărilor cromatografice şi separat la pigmenţii principali — luteina şi zeaxantina —, care, deşi sînt dixantofili, prin faptul că au structură moleculară diferită (α- şi, respectiv, β-iononică), se separă, se identifică şi se dozează cu uşurinţă faţă de restul carotenoidelor.

Conţinutul carotenoidelor provitaminice s-a stabilit prin însumarea conţinutului carotenoidelor hidrocarburice cu al criptoxantinelor (α- şi β-criptoxantină), iar conţinutul total al carotenoidelor s-a stabilit prin însumarea tuturor categoriilor de pigmenţi determinaţi. Boabele de porumb analizate nu s-au tratat cu criptodin sau alte fungicide.

Extragerea, identificarea şi dozarea pigmenţilor carotenoidici s-au făcut cu ajutorul metodelor cromatografice şi spectrofotometrice, la fel ca în lucrările anterioare (1)—(4).

Pentru dozarea elementelor minerale s-au folosit cîte 0,2 grame de făină prospăt obţinută, care s-a mineralizat pe cale umedă. Din soluţia obţinută prin mineralizare, azotul total s-a determinat prin metoda Kjeldahl, K, Na, Ca, Mg prin absorbţie atomică, iar P spectrofotometric (9).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Conţinutul mediu al pigmenţilor carotenoidici, exprimat în μg/g, şi conţinutul mediu procentual al unor elemente minerale (N, P, K, Na, Ca, Mg) din boabele de porumb a 20 de hibrizi diploizi şi din 20 de hibrizi opaque-2 sînt redate în tabela 1.

Tabela 1

Conţinutul mediu al pigmenţilor carotenoidici, al azotului, fosforului, potasiului, sodiului, calciului şi magneziului din boabele a 20 de hibrizi de porumb diploizi, obţinuţi în 1980, şi din 20 de hibrizi opaque-2, obţinuţi în 1982

Carotenoide şi elemente minerale	Porumb diploid			Porumb opaque-2		
	analize în 1980	analize în 1984	diferenţa, în %	analize în 1982	analize în 1984	diferenţa, în %
a. Carotenoide, în μg/g boabe						
Carotenoide hidrocarburice	2,46	1,65	33	1,96	1,58	19,4
Criptoxantine	2,68	2,03	24	2,35	1,98	15,7
Luteină	9,80	8,27	15,6	11,34	10,12	11
Zeaxantină	14,23	11,76	17,4	9,21	8,07	12,4
Epoxizi carotenoidici	3,56	3,18	10,7	4,38	4,05	7,5
Carotenoide provitaminice	5,14	3,68	28,4	4,31	3,56	17,4
Carotenoide totale	32,73	26,84	18	29,24	25,80	11,76
b. Elemente minerale în %						
Azot	2,545	2,014	21	2,373	2,294	11
Fosfor	0,485	0,372	23,3	0,583	0,495	15
Potasiu	0,236	0,218	7,6	0,243	0,232	4,7
Sodiu	0,045	0,046	2,2	0,062	0,061	1,6
Calciu, sub	0,02	0,02	0,0	0,02	0,02	0,0
Magneziu	0,079	0,076	3,8	0,107	0,105	1,9
Total elemente minerale	3,44	2,747	—	3,682	3,31	—

S-a recurs la această formă mai sintetică de prezentare a rezultatelor atît din dorința de a face economie de spațiu, cît mai ales datorită faptului că la unii hibrizi diploizi și opaque-2 deosebirile dintre conținutul carotenoidelor și al elementelor minerale din boabele de porumb determinat în 1980 și, respectiv, 1982 pentru porumbul opaque-2 față de conținutul stabilit în 1984 sînt mici, nesemnificative, uneori sub limita erorii admise a metodelor de dozare. Deosebiri mici între conținutul carotenoidelor sau al elementelor minerale din boabele aceluiași hibrid de porumb apar în mod frecvent la analize paralele sau succesive într-o perioadă de timp apropiată, datorită neuniformizării boabelor din probele de analiză, poziției știuleților pe tulpină (la soare sau la umbră), poziției boabelor pe cocean, vigurozității plantelor, cantității de macro- și microelemente absorbite din sol, stării fiziologice a plantelor etc.

Din determinările efectuate reiese că hibrizii diploizi au un conținut mediu de carotenoide totale și de carotenoide provitaminice în boabe mai mare decît conținutul mediu al carotenoidelor similare din boabele porumbului opaque-2. Comparația trebuie făcută între conținutul carotenoidelor existent în anii de obținere a celor două categorii de hibrizi (1980 pentru hibrizii diploizi și 1982 pentru porumbul opaque-2), precum și între conținutul carotenoidelor existent în boabele hibrizilor diploizi și opaque-2 în 1984, după o perioadă de păstrare de patru și, respectiv, doi ani. În ceea ce privește conținutul mediu al pigmenților principali — luteina și zeaxantina — , în porumbul diploid predomină cantitativ zeaxantina, iar în porumbul opaque-2 luteina. Porumbul opaque -2 se caracterizează printr-un conținut mai ridicat de luteină și de epoxizi carotenoidici față de porumbul diploid, pigmenți care determină culoarea galbenă mai pronunțată a boabelor acestui fel de porumb. În cazul porumbului diploid, boabele au o culoare portocalie cu nuanțe slab gălbui, datorită conținutului mai ridicat de carotenoide cu structură β-iononică, în mod deosebit de zeaxantină, β-carotină și β-criptoxatină.

Conținutul pigmenților carotenoidici totali, al celor pe grupe de carotenoide (carotenoide hidrocarburice, criptoxantine, epoxizi carotenoidici, carotenoide provitaminice) și al celor individuali (luteină, zeaxantină) din hibrizii diploizi este mai mare în boabele analizate în 1980, anul obținerii hibrizilor, decît conținutul carotenoidelor similare din boabele acelorași hibrizi analizați în 1984. Din această comparație reiese cu ușurință că, în timpul păstrării boabelor de porumb, se produce o degradare a tuturor tipurilor și grupelor de carotenoide, deși condițiile de păstrare a porumbului au fost optime. Apreciem că aceste pierderi în conținutul carotenoidelor, ca și al elementelor minerale, se datoresc proceselor fiziologice care au loc în embrionii și în endospermul semințelor, proceselor biochimice catabolice, în mod deosebit respirației, influenței prelungite a factorilor de mediu (O_2, CO_2, H_2O, radiații luminoase etc.), precum și acțiunii microorganismelor.

Porumbul opaque-2 suferă și el o scădere similară a conținutului pigmenților carotenoidici în timpul păstrării.Boabele hibrizilor de porumb opaque-2 analizate în 1982 au un conținut total și pe diferite tipuri de carotenoide mai mare decît boabele acelorași hibrizi analizate în 1984, după doi ani de păstrare.

Procentul conținutului de carotenoide degradate (totale și pe fracțiuni) din boabele de porumb, în timpul păstrării acestora, este mai mic la porumbul opaque-2 decît la porumbul diploid, atît datorită scurtării la jumătate a perioadei de păstrare, cît și datorită probabil faptului că în

porumbul opaque-2 se află o cantitate mai mare de carotenoide sub formă de complexe carotenoproteice decît în porumbul diploid. Complexele carotenoproteice și esterii carotenoidici sînt mai rezistenți la acțiunea factorilor fizico-chimici din mediul înconjurător decît carotenoidele în stare liberă. Cu toate că perioada de păstrare a boabelor de porumb opaque-2 este jumătate din cea a prorumbului diploid, procentul de degradare a carotenoidelor la porumbul opaque-2 este mai mare decît jumătate a procentului de degradare a carotenoidelor din porumbul diploid. Acest aspect considerăm că se datorează diminuării proceselor fiziologice și biochimice din embrionii semințelor în timpul păstrării acetora. Procesele metabolice sînt mai intense în semințe la începutul perioadei de păstrare. Pe măsură ce se consumă oxigenul și se acumulează CO_2, în spațiile dintre semințe, ca rezultat al respirației, se micșorează procesele metabolice aerobe și apare respirația anaerobă, care determină formarea de alcool etilic, cu efecte negative asupra ambrionului, iar semințele își pierd capacitatea de germinare.

Dacă se analizează procentul de carotenoide degradate, totale și pe diferite fracțiuni, în timpul păstrării boabelor celor două categorii de porumb, se constată că pe primul loc se situează carotenoidele hidrocarburice, cu un procent de degradare de 33% la porumbul diploid și de 19,4% la porumbul opaque-2, după care urmează, în ordine descrescîndă, criptoxantinele (care sînt monoxantofile), luteina, zeaxantina și epoxizii carotenoidici. Luteina și zeaxantina, deși sînt dixantofile, au un procent diferit de degradare, datorită conținutului diferit și mai ales lungimii diferite a sistemului cromoforic. Zeaxantina are 11 duble legături conjugate în moleculă, iar luteina are numai 10, fapt pentru care prezintă o stabilitate mai mare la acțiunea luminii și a oxigenului decît zeaxantina.

Dintre carotenoidele cercetate, epoxizii au procentul cel mai mic de degradare, deși acești pigmenți apar frecvent ca produși intermediari în procesul de degradare a celorlalte carotenoide. Diferențele mici dintre conținutul epoxizilor carotenoidici din boabele de porumb după doi și, respectiv, patru ani de păstrare a acestora s-ar datora formării de noi epoxizi din celelalte carotenoide, concomitent cu degradarea celor existenți inițial în boabele de porumb. Procentul de degradare a carotenoidelor provitaminice provine din media procentului de degradare a carotenoidelor hidrocarburice și a criptoxantinelor. Procentul mai mic de degradare a dixantofilelor (luteină, zeaxantina) și a epoxizilor xantofilici se datorează și faptului că o bună parte din conținutul acestor pigmenți se găsește sub formă de complexe carotenoproteice și de esteri, care, după cum s-a menționat anterior, au o stabilitate mai mare decît carotenoidele în stare liberă.

Procentul de degradare a carotenoidelor totale are valori relativ mici, de 18 și, respectiv, 11,76 %, fapt ce denotă că boabele de porumb s-au păstrat în condiții optime. Se cunosc cazuri cînd procentul de degradare a carotenoidelor totale din boabele de porumb este cuprins între 30 și 50% în timp de 12 luni (10), (11), (12). Prin păstrarea boabelor de porumb în condiții optime se realizează nu numai o prelungire a viabilității semințelor, dar și o reducere minimă a conținutului compușilor organici și anorganici.

Conținutul mediu procentual al elementelor minerale cercetate (N, K, P, Na, Ca, Mg) suferă, în general, modificări mai mici în timpul păstrării boabelor de porumb diploid și opaque-2 decît pigmenții carotenoidici. Porumbul opaque-2 are un conținut mediu total de elemente minerale mai mare decît porumbul diploid.

Conținutul mediu total al elementelor minerale din boabele de porumb diploid obținut în 1980 și din boabele de prorumb opaque-2 obținut în 1982 este mai mare decît conținutul elementelor minerale din boabele aceloraşi hibrizi de porumb analizați în 1984. Din datele obținute reiese că și elementele minerale își micșorează, în general, conținutul în timpul păstrării boabelor de porumb. Dintre elementele minerale cercetate, variații mai semnificative la ambele categorii de porumb se constată în conținutul azotului, fosforului și potasiului. Calciul are un conținut relativ constant sub 0,02%. Variațiile în conținutul sodiului și al magneziului sînt mici și nesemnificative, sub limita erorii admise. Procentul cel mai mare de pierderi în timpul păstrării porumbului se produce la fosfor și azot. Atît fosforul, cît și azotul se găsesc în boabele de porumb sub formă de compuși anorganici și organici. În procesele catabolice din embrionii boabelor de porumb, degradări mai accentuate suferă probabil compușii organici ai acestor elemente (acizi nucleici, ATP, nucleozide, aminoacizi, proteine, amine, porfirine etc.).

Procentul cu care se micșorează conținutul elementelor minerale din boabele de porumb diploid este mai mare decît cel din porumbul opaque-2, datorită perioadei mai lungi de păstrare a porumbului diploid. Pe baza procentului de micșorare a conținutului elementelor minerale, se poate stabili, la ambele categorii de porumb, următoarea ordine descrescîndă a micșorării conținutului elementelor cercetate : fosfor, azot, potasiu, magneziu, sodiu, calciu. Dacă micșorarea conținutului fosforului și al azotului în timpul păstrării porumbului se poate explica prin degradarea compușilor organici ai acestor elemente în procesele catabolice din embrionii semințelor și eliminarea unor compuși (NH_3, H_3P, substanțe volatile etc.), pentru modificarea conținutului celorlalte elemente minerale nu găsim explicații potrivite. Pentru explicarea acestui fenomen sînt necesare noi cercetări deoarece cunoștințele actuale despre degradarea elementelor minerale în timpul păstrării semințelor sînt neconcludente (13).

CONCLUZII

1. Conținutul carotenoidelor totale și pe diferite fracțiuni din porumbul diploid și opaque-2 se micșorează în timpul păstrării boabelor de porumb proporțional cu perioada de păstrare a acestora.

2. Degradarea carotenoidelor din boabele de porumb diploid și opaque-2 se datorește proceselor catabolice din embrionii și endospermul semințelor și influenței factorilor de mediu, fiind mai intensă la carotenoidele provitaminice (carotenoide hidrocarburice, criptoxantine), moderată la dixantofile (zeaxantină, luteină) și redusă la epoxizii carotenoidici.

3. Conținutul elementelor minerale (Na, Ca, Mg), cu excepția azotului, fosforului și parțial a potasiului, variază puțin, nesemnificativ în timpul păstrării boabelor de porumb.

4. Micșorarea mai accentuată a conținutului fosforului, azotului și parțial a potasiului apreciem că se datorează degradării compușilor organici în care se găsesc aceste elemente, în procesele catabolice care au loc în embrionii și endospermul boabelor de porumb.

5. Scăderea conținutului carotenoidelor și al elementelor minerale cercetate din boabele de porumb, raportată la perioada de păstrare, este mai intensă la porumbul opaque-2 decît la cel diploid, fapt ce denotă că

degradarea compușilor organici și a celor anorganici se produce mai intens în primii ani de păstrare a boabelor, cînd și procesele biochimice din embrionii și endospermul semințelor de porumb sînt mai intense.

Prezentat la redacție
la 6 februarie 1985

* *Disciplina de chimie și biochimie vegetală, Institutul agronomic „Dr. Petru Groza" Cluj-Napoca*
** *Stațiunea de cercetări agricole Turda, jud. Cluj*
*** *Laboratorul de izotopi radioactivi, Institutul agronomic „Dr. Petru Groza" Cluj-Napoca*

BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS OF CAROTENOIDS IN MAIZE. IV. ALTERATION OF CAROTENOID- AND SOME MINERAL ELEMENT CONTENTS (N, K, P, Na, Ca, Mg) IN GRAINS OF CERTAIN HYBRIDS OF DIPLOID AND OPAQUE-2 MAIZE DURING STORAGE

Summary

The authors determined the content of carotenoid pigments, per carotenoid types, as well as the content of certain mineral elements (N, K, P. Na, Ca, Mg) in the grains of 20 hybrids of diploid maize and in 20 hybrids of opaque-2 maize in the same year when they were obtained and in their grains after a storage period of four and two years, respectively.

When stored, the content of carotenoids and that of some mineral elements (nitrogen, phosphorus) lowers significantly, probably because of the catabolic biochemical processes taking place in the embryo and endosperm of maize grains and because of the influence of environmental factors (O_2, CO_2, H_2O, light, etc.).

The decrease in the carotenoid content of both categories of maize takes place in the following order : carbohydrate carotenoids, cryptoxanthin, zeaxanthin, luteine, carotenoid epoxides.

BIBLIOGRAFIE

1. G. NEAMȚU, GH. ILLYES, ECATERINA PESCARU, Buletin IACN-A, **36**, 55 (1982).
2. G. NEAMȚU, C. PANFIL, GH. ILLYES, K. L. SIMPSON, St. cerc. biochim., **26**, 58 (1983).
3. G. NEAMȚU, I. CĂBULEA, C. BOTEZ, GH. ILLYES, FL. IRIMIE, St. cerc. biochim., **27**, 63 (1984).
4. G. NEAMȚU, I. CĂBULEA, AUGUSTA LUJERDEAN, FL. IRIMIE, St. cerc. biochim., **27**, 143 (1984).
5. I. CĂBULEA, *Proceedings of the fifth meeting of the maize and sorgum section of Eucarpia*, sub red. I. KOVACS, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1971, p. 85.
6. T. W. GOODWIN, *The biochemistry of the carotenoids*, vol. I : *Plants*, Chapman and Hall, London—New York, 1980, p. 77.
7. C. O. GROGAN, C. W. BLESSIN, Crop Science, **8**, 730 (1968).
8. T. W. GOODWIN, *Chemistry and biochemistry of plants pigments*, Academic Press, London—New York, second edition, vol. I, 1976, p. 624.
9. * * * *The analysis agricultural materials*, Technical Bulletin, **27**, London (1973).
10. O. ISLER, *Carotenoids*, Birkhäuser-Verlag, Basel-Stutgart, 1971, p. 37, 288, 602, 788.
11. P. N. DUA, E.J. DAY, C. O. GROCAN, Agronom. J., **57** 501 (1965).
12. D. A. TICHENAR, D. C. MARTIN, C. E. WELLS, Food Tehnol., **19**, 106 (1965).
13. O. L. JUSTICE, L. N. BASS, *Principles and practices of seep storage*, Dept. of Agriculture, Agric. Haddbook, nr. 509, 1978. p. 91.

VARIAȚIA ELIMINĂRII URINARE A ACIDULUI 5-HIDROXI-INDOLACETIC ÎN IRADIERI TERAPEUTICE

RADU OLINESCU, DIDINA COJOCEA, ELEONORA PASCU, STELA GIORGIONE

Rezumat. Eliminarea urinară a acidului 5-hidroxi-indolacetic a fost studiată la un lot de 30 de pacienți cu tumori cerebrale, înainte și după iradiere terapeutică prin două metode, fracționată și „în split". Indiferent de stadiul și de localizarea tumorii, după iradiere se constată o creștere a excreției urinare de 5-HIA, concomitent cu o scădere a nivelului grupărilor SH libere plasmatice. Atît maximul, cît și minimul variației celor doi parametri au fost observați la mijlocul perioadei de iradiere. Variațiile celor doi parametri par să fie legate prin intermediul triptofanoxigenazei.

Acidul 5-hidroxi-indolacetic (5-HIA) este principalul catabolit al serotoninei, fiind eliminat în special prin urină. O eliminare crescută de 5-HIA a fost observată la om și la animale în urma diferitelor feluri de stress, cum ar fi șoc anafilactic (1), expunere la frig (2), administrare de histamină sau adrenalină (2), arsuri (3), operații chirurgicale (4). Din diverse stări patologice cercetate, numai în sindromul carcinoid s-a constatat o creștere a excreției urinare de 5-HIA (5).

O creștere semnificativă a excreției urinare de 5-HIA a fost observată și după iradierea totală experimentală cu doze depășind $DL_{50}/30$(2), (6)—(9). Naftalin (10) a observat o creștere a excreției 5-HIA și la pacienți iradiați terapeutic cu raze X, avînd tumori cu localizări necerebrale. La șobolani (9), o creștere semnificativă a excreției 5-HIA a fost observată începînd cu doze de 200 Rads, maximul eliminării fiind la 24 de ore de la iradiere, valorile revenind la normal după 3 zile. Efectul observat pare mai puternic la femele decît la masculi (9), deși la alte specii acesta nu a fost confirmat (6), (7).

Știind că serotonina este un mediator important în sistemul nervos central, am studiat eliminarea urinară a 5-HIA la pacienți cu tumori cerebrale iradiați terapeutic, atît cu doze mici, fracționate, cît și cu doze mai mari, „în split".

MATERIAL ȘI METODE

Studiul clinico-biochimic a fost efectuat pe un lot de 30 de pacienți (18 bărbați și 12 femei) cu tumori cerebrale operate, fără sechele majore postoperatorii, cărora li s-a efectuat telecobaltoterapie în două cure la interval de 30 de zile. Au fost aplicate două metode de iradiere: fracționată, constînd în iradieri zilnice, cu 200—300 Rads/T, 5 zile pe săptămînă, pînă la doza totală de 3 000 Rads/T; iradierea „în split", cu o doză de 850 Rads/T, o dată pe săptămînă.

Studiul clinic și biochimic a fost efectuat înainte, după 1500 și după 3000 Rads/T la prima metodă. Pacienții iradiați cu 850 Rads/T au fost investigați la 24 de ore de la iradiere. În toate cazurile, fiecare pacient a fost propriul lui martor, iar reacția primară se datorează edemului cerebral și hipertensiunii intracraniene. Modificări clinice au fost constatate la 83% din pacienții iradiați „în split" (12 cazuri) și la 68% din cei iradiați fracționat.

Acidul 5-hidroxi-indolacetic a fost determinat în urina din 24 de ore, după metoda Dalgliesh (11), iar grupările sulfhidril (SH) libere din plasmă după metoda Ellman modificată (12), (13).

Lotul de pacienți nu a fost foarte omogen, datorită localizării și stadiului diferit al tumorii, precum și particularităților individuale, de care s-a ținut seama la aplicarea iradierii. Din aceste motive, din cei 30 de pacienți s-au ales grupuri mai mici cu trăsături comune, mai ales ca localizare și stadiu al tumorii, ca și metoda folosită la iradiere.

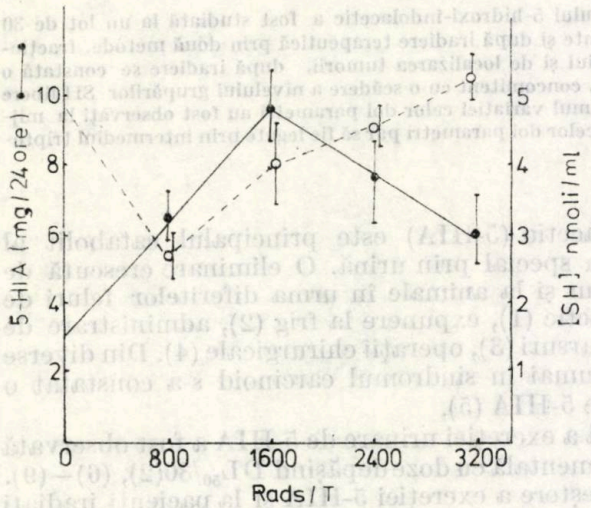


Fig. 1. — Variațiile excreției urinare a 5-HIA (————) și ale grupărilor SH plasmatice (— — — —) la pacienți cu tumori cerebrale iradiați fracționat.

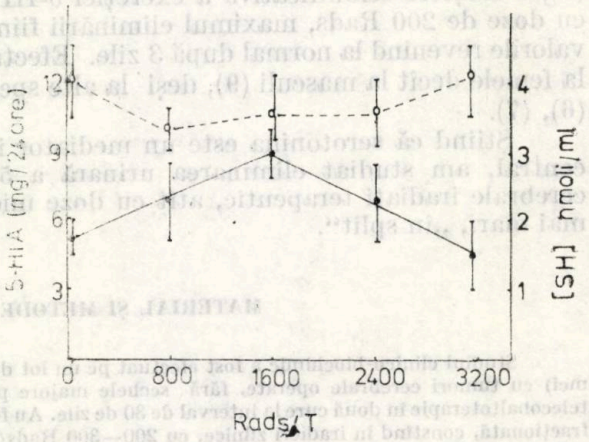


Fig. 2. — Variațiile excreției urinare a 5-HIA (————) și ale grupărilor SH plasmatice (— — — —) la pacienți cu glioblastom iradiați „în split", 800 Rads/T.

Astfel, în cazul glioblastomului, ambele metode de iradiere produc creșterea excreției 5-HIA și scăderea grupărilor SH libere chiar după prima iradiere (fig. 1 și 2). În ambele cazuri maximul excreției 5-HIA coincide cu minimul scăderii grupărilor SH libere plasmatice, situîndu-se între 800 și 1000 Rads/T. După 2000 Rads/T se observă o tendință de revenire la valorile inițiale pentru ambii parametri biochimici.

În cazul astrocitomului (fig. 3), maximul excreției 5-HIA se situează tot în jur de 1500 Rads/T, după o creștere semnificativă la 800 Rads/T;

în schimb, grupările SH plasmatice cresc după prima iradiere și revin către valorile inițiale.

În cazul adenomului hipofizar (fig. 4), iradierea fracționată determină o primă creștere a excreției 5-HIA după 800 Rads/T, dar și un al doilea maxim la 3000 Rads/T, pe cînd prin metoda de iradiere „în split" maximul

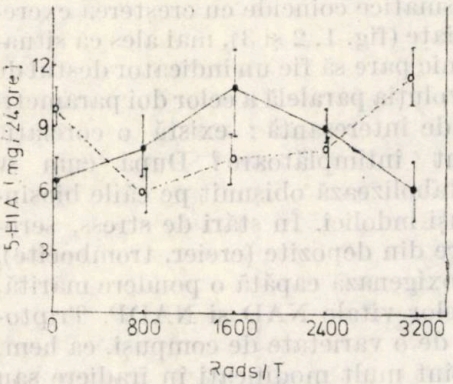


Fig. 3. — Variațiile excreției urinare a 5-HIA (————) și ale grupărilor SH libere plasmatice (— — — —) la pacienți cu astrocitom iradiați „în split", 800 Rads/T.

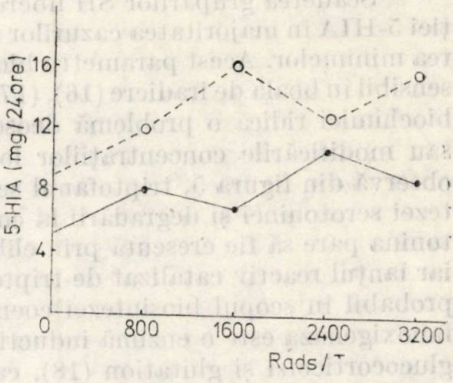


Fig. 4. — Modificările excreției urinare a 5-HIA la doi pacienți cu adenom hipofizar iradiați fracționat cu 250 Rads/T (————) și al doilea prin metoda „în split" (— — — —) cu 800 Rads/T.

excreției 5-HIA se păstrează la 1500 Rads/T. Determinarea grupărilor SH libere plasmatice nu a arătat variații semnificative.

DISCUȚII

Serotonina sau 5-hidroxitriptamina a fost destul de mult studiată din punctul de vedere al variațiilor cantitative în diferite stări patologice. Astfel s-au acumulat suficiente probe în favoarea posibilității de eliberare a serotoninei din depozite (creier, trombocite) sub influența radiațiilor ionizante (14), (15). Din cauza unor tehnici de măsurare mai dificile, determinarea serotoninei din sînge nu a dat rezultate atît de semnificative ca acelea obținute prin studiul excreției urinare a acidului 5-hidroxi-indolacetic, principalul metabolit al acestui mediator chimic.

După cum s-a menționat în introducere, determinarea excreției urinare de 5-HIA a demonstrat o creștere precoce după 24 de ore de la o iradiere totală experimentală, precum și existența unei relații între doza iradierii și intensitatea excreției (6), (9).

Excreția crescută de 5-HIA constatată în boala de iradiere trebuie corelată cu concentrațiile mari observate după diferite feluri de stress (1), (2). Atît intensitatea stressului, cît și doza de iradiere nu par să fie foarte mari pentru a determina o creștere semnificativă a excreției 5-HIA. Datele noastre arată (fig. 1—4) o creștere a excreției 5-HIA chiar după prima iradiere „în split" sau după acumularea unei doze de 800 Rads/T prin iradiere fracționată. Lucrarea noastră mai demonstrează marea influență a localizării

tumorii și a metodei de iradiere asupra variației 5-HIA. În general, iradierea „în split" produce modificări mai mari decît iradierea fracționată. După cum arată datele noastre, în iradierea terapeutică doza de 800 Rads/T pare să fie pragul minim, iar cea de 1500 Rads/T pragul maxim. Consecința creșterilor serotoninei și a 5-HIA pare să fie o manifestare biochimică nespecifică comună stărilor de stress, cu consecințe clinice încă necunoscute.

Scăderea grupărilor SH libere plasmatice coincide cu creșterea excreției 5-HIA în majoritatea cazurilor studiate (fig. 1, 2 și 3), mai ales ca situarea minimelor. Acest parametru biochimic pare să fie un indicator destul de sensibil în boala de iradiere (16), (17). Evoluția paralelă a celor doi parametri biochimici ridică o problemă deosebit de interesantă : există o corelație sau modificările concentrațiilor lor sînt întîmplătoare? După cum se observă din figura 5, triptofanul se metabolizează obișnuit pe căile biosintezei serotoninei și degradării la compuși indolici. În stări de stress, serotonina pare să fie crescută prin eliberare din depozite (creier, trombocite), iar lanțul reactiv catalizat de triptofanoxigenază capătă o pondere mărită, probabil în scopul biosintezei coenzimelor vitale NAD și NADP. Triptofanoxigenaza este o enzimă inductibilă de o varietate de compuși, ca hem, glucocorticoizi și glutation (18), care sînt mult modificați în iradiere sau alte tipuri de stress. Cum grupările SH plasmatice sînt strîns legate de concentrația glutationului (19), ar putea exista o astfel de corelație cu atît mai mult cu cît și triptofanul și glutationul au reacțiile metabolice mult

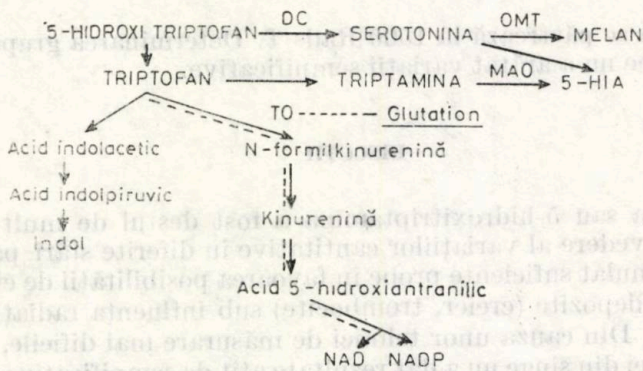


Fig. 5. — Schema conexiunilor dintre reacțiile metabolice ale triptofanului și serotoninei. Reacțiile a căror pondere predomină fiziologic sînt prezentate cu o linie îngroșată, iar cele a căror activitate crește după iradiere sau stress sînt menționate cu o săgeată întreruptă. Pentru lanțul biosintetic al NAD au fost menționați doar compușii intermediari mai importanți : DC = decarboxilază, OMT = o-metiltransferază, MAO = monoaminoxidază, TO = triptofanoxigenază.

modificate în boala de iradiere (20). Oricum, determinarea celor doi parametri oferă posibilitatea studierii eficienței iradierii terapeutice și a unei metode de investigare a homeostaziei biochimice, în care cei doi aminoacizi și metaboliții lor sînt mult implicați.

Prezentat în redacție
la 13 mai 1985

Spitalul clinic Fundeni, București
Clinica de radiobiologie

THE VARIATIONS OF THE 5-HYDROXY INDOLEACETIC ACID ELIMINATION IN URINE FOLLOWING THERAPEUTICAL IRRADIATIONS

Summary

The urinary elimination of 5-hydroxy indoleacetic (5-HIA) was studied in a group of 30 patients with cerebral tumors, before and following therapeutical irradiation with two methods, fractioned and "in split". Regardless of the localization and the stage of the tumors following irradiation, a significant increase of the urinary elimination of 5-HIA, in parallel with a decrease of the level of the free, plasmatic SH groups was recorded. Both the maximum and the minimum of the studied parameters were observed after the first half of the irradiation period. The variations of both parameters seem to be connected at the level of tryptophane oxygenase, which is regulated by glutathione.

BIBLIOGRAFIE

1. J. LE COMPTE, P. FISCHER, Arch. Int. Physiol. Biochem., **66**, 50 (1956).
2. J. RENSON, P. FISCHER, Arch. Int. Physiol. Biochem., **67**, 142 (1959).
3. S. A. JOHANSSON, Acta Physiol. Scand., **48**, 126 (1960).
4. N. CRAWFORD, G. T. WATTS, Nature, **195**, 182 (1962).
5. B. J. HAVERBACK, A. SJOERSDMA, L. TERRY, New Engl. J. Med., **113**, 270 (1956).
6. H. J. MELCHING, H. ERNST, H. ROSLER, Strahlentherapie, **255**, 394 (1960).
7. J. RENSON, J. Physiol., **52**, 208 (1960).
8. M. RANDIC, Z. SUPEK, Int. J. Rad. Biol., **4**, 154 (1961).
9. Z. DEANOVIC, Z. SUPEK, M. RANDIC, Int. J. Rad. Biol., **7**, 1 (1963).
10. L. NAFTALIN, Second Int. Conf. Radiobiol., 1962, Harowgate, p. 88.
11. C. E. DALGLIESH, Advanc. Clin. Chem., **1**, 207 (1958).
12. G. L. ELLMAN, Arch. Biochem. Biophys., **82**, 70 (1959).
13. I. MĂRGINEANU, R. OLINESCU, Rev. Roum. Biochim., **11**, 103 (1974).
14. D. J. PALAIC, Z. SUPEK, Int. J. Rad. Biol., **9**, 601 (1965).
15. K. I. ALTMAN, G. B. GERBER, S. OKADA, *Radiation biochemistry*, vol. 2, Academic Press, New York, 1970.
16. Z. M. BACQ, P. ALEXANDER, *Chemical protection against ionizing radiations*, Ch. Thomas, Springfield (Illinois), 1965.
17. R. OLINESCU, S. NIȚĂ, Rev. Roum. Biochim., **11**, 121 (1974).
18. R. OLINESCU, E. PASCU, Rev. Roum. Biochim., **11**, 185 (1974).
19. L. FLOHE, H. BENHOR, H. SIES, A. WENDEL, *Glutathione*, Georg Thieme Publisher, Stuttgart, 1974.
20. V. VOICU, R. OLINESCU, *Mecanisme enzimatice în farmacodinamie*, Edit. științifică, București, 1977, cap. 7.

PIGMENȚI CAROTENOIDICI DIN CÎTEVA SOIURI ȘI POPULAȚII DE *LOLIUM PERENNE*

V. TĂMAȘ, V. POPESCU

Rezumat. S-a stabilit natura și conținutul pigmenților carotenoidici din opt soiuri și populații de *Lolium perenne*. Cel mai bogat în carotenoide (provitamine A) s-a dovedit soiul Barenza, fapt pentru care se recomandă cultivarea lui în pajiști temporare pentru furajarea animalelor.

Alimentația animalelor cu furaje verzi asigură nu numai o nutriție rațională și bogată în proteine și glucide, ci și necesarul de provitamine și vitamine. Furajele bogate în provitamine A sînt deosebit de valoroase pentru animale și pot fi realizate pe parcele cultivate, prin prepararea și conservarea lor în mod corespunzător. Prin însilozare, totodată, se pot asigura cantități relativ mari de provitamine A (1). O lipsă sau o cantitate scăzută de provitamine A din furaje determină o valoare scăzută a carotenemiei, fapt ce constituie un parametru biochimic în diagnosticarea bolilor la animale. De asemenea, o valoare scăzută a carotenoidelor în lapte demonstrează că furajarea s-a realizat cu furaje de calitate necorespunzătoare (2), (3). Atît o hipocarotenemie, cît și o hipovitaminoză A la animale sînt determinate de un aport insuficient de provitamină A în furaje, precum și de lipsa din organism a unei proteine albuminice specifice, capabilă să transporte vitaminele A (proteină transportoare de retinol = PTR).

În cercetările cu privire la specia *Lolium perenne* s-au abordat diverse aspecte, din care în lucrarea de față sînt prezentate cele referitoare la natura și la cantitatea pigmenților carotenoidici.

MATERIAL ȘI METODE

S-au experimentat opt variante, și anume cinci soiuri străine și trei populații românești. S-a lucrat în seră, în ghivece nutritive, cîte trei semințe într-un ghiveci. După răsărire s-au îndepărtat două plantule din ghiveci, rămînînd numai una. Cînd plantele au avut trei frunze, la mijlocul lunii mai, s-au plantat în cîmp, la distanțe de 50/50 cm.

Fiecare variantă, care a reprezentat un soi, a cuprins 24 de tufe, fiecare tufă provenind dintr-o sămînță.

Terenul, situat în zona municipiului Cluj-Napoca, în punctul numit Șapca Verde, cu o suprafață experimentală de 84,5 m^2, a fost bine pregătit, lipsit de buruieni.

Pentru determinarea pigmenților carotenoidici, materialul a fost uscat la temperatura camerei, apoi în etuvă la 70°C timp de cinci ore și la 95°C timp de o oră.

Separarea carotenoidelor s-a efectuat prin metoda cromatografică, iar dozarea pe cale spectrofotometrică (4).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul și natura carotenoidelor la soiurile și populațiile de *Lolium perenne* cercetate sînt redate în tabela 1, eșalonate în ordinea conținutului total în carotenoide.

Din tabela 1 reiese că soiurile și populațiile de *Lolium perenne* cercetate au un conținut total în carotenoide cuprins între 3,99 și 22,83 mg/100 g material uscat. Limita inferioară a conținutului în carotenoide este pentru soiul Scempter de 3,99, iar limita superioară de 22,83, fiind de șase ori mai

Tabela 1

Natura și conținutul pigmenților carotenoidici în diferite soiuri și populații de *Lolium perenne* (în mg/100 g material uscat)

Soi și populație	β-caroten		Luteină globală*		Carotenoide totale
	cantitate	%	cantitate	%	
Soiul Scempter	0,59	15	3,99	85	3,99
Populația de Fundulea	1,52	15	9,10	85	10,75
Populația de Banat	3,10	20	12,40	80	15,50
Soiul Melle	4,17	22	14,80	78	18,52
Soiul Scempter Weidetyp	3,73	20	14,94	80	18,68
Soiul Hora	4,10	22	14,88	78	18,98
Populația de Cluj	5,35	25	16,06	75	21,41
Soiul Barenza	6,85	30	15,98	70	22,83

* Luteina globală include luteină, violaxantină și flavoxantină.

mare la soiul Barenza. Populația de Cluj are o valoare în carotenoide apropiată de soiul Barenza. Se observă, de asemenea, că populația de Banat și soiurile Melle, Scempter Weidetyp și Hora au un conținut în carotenoide destul de apropiat.

Conținutul de provitamină A (β-caroten) este cuprins între 0,59 și 6,85 mg la 100 g material. Cea mai mare cantitate de provitamină A se află în soiuri Barenza. Raportul dintre provitamina A și luteina globală este de 1 : 3 pînă la 1 : 4.

Conținutul de β-caroten este un parametru deosebit de valoros în ameliorarea, selecționarea și cultivarea diferitelor soiuri de plante furajere, îndeosebi pentru *Lolium perenne*, care este bine valorificat de animale.

CONCLUZII

Din datele prezentate se desprinde că, din varietățile de *Lolium perenne* cercetate, cel mai bogat în carotenoide, respectiv în provitamină A, este soiul Barenza. Acest soi prezintă și o productivitate mare, fapt pentru care se recomandă cultivarea lui pentru furajarea animalelor, îndeosebi în pajiștile cultivate temporar pentru pășunat.

Prezentat la redacție
la 6 februarie 1985

Facultatea de zootehnie și medicină veterinară,
Institutul agronomic „Dr. Petru Groza",
Cluj-Napoca, str. Mănăștur nr. 3

CAROTENOID PIGMENTS IN SOME VARIETIES AND POPULATIONS OF *LOLIUM PERENNE*

Summary

In ascertaining the nature and content of carotenoids in varieties and populations of *Lolium perenne*, the Barenza strain has proved to be the

richest in provitamins A, which makes it recommendable for cultivation in seasonal meadows for the feeding of animals.

BIBLIOGRAFIE

1. V. POPESCU, V. TĂMAȘ, MARIA ALBU, Buletinul Institutului agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj-Napoca, **30**, 23 (1976).
2. V. TĂMAȘ, O. Z. BABIO, St. cerc. biochim., **25**, 183 (1982).
3. V. TĂMAȘ, E. ANGI, E. ȘUTEU, St. cerc. biochim., **16**, 309 (1973).
4. V. TĂMAȘ, GH. SĂLĂJAN, C. BODEA, St. cerc. biochim., **13**, 423 (1970).

ACTIVITATEA UNOR ENZIME HIDROLITICE LA PLANTELE DE CULTURĂ TRATATE CU METILCLOR

ELVIRA TĂNASE, VLAD ARTENIE, G. LUPAȘCU

Rezumat. S-a studiat intensitatea amilolizei, a hidrolizei esterilor organofosforici și a proteolizei în semințele plantelor de mazăre, *Pisum sativum* (soiurile Hermonora și Bordy), și de bob, *Vicia faba* (soiul Minor), provenite din semințe tratate înainte de însămînțare cu metilclor. Preparatele de metilclor inhibă activitatea α-amilazei și a fosfomonoesterazei acide la ambele soiuri de mazăre, iar activitatea proteinazelor numai la soiul Hermonora. În cazul bobului, metilclorul activează cele trei enzime studiate : fosfomonoesteraza acidă mai puternic, α-amilaza moderat, iar proteinazele mai slab.

Dezvoltarea industriei chimice moderne a condus la introducerea în mediul natural a numeroase substanțe străine organismelor vii. Utilizarea unor noi pesticide pentru combaterea dăunătorilor agricoli impune cunoașterea acțiunii exercitate de aceste combinații chimice asupra proceselor metabolice caracteristice animalelor și plantelor. În cadrul investigațiilor se pot obține informații prin determinarea activității enzimelor ce catalizează diferite reacții biochimice în celula animală sau vegetală, după tratamentul cu substanțele testate.

În lucrarea de față se prezintă rezultatele cercetărilor privind intensitatea amilolizei, a hidrolizei esterilor acidului ortofosforic și a proteolizei în semințele plantelor de mazăre și de bob, provenite din semințe tratate pregerminatoriu cu două preparate de metilclor (dimetildifeniltricloretan). Procesele biochimice menționate s-au apreciat după activitatea α-amilazei (EC 3.2.1.1), a fosfomonoesterazei acide (EC 3.1.3.2) și a proteinazelor (EC 3.4).

MATERIAL ȘI METODE

Activitatea α-amilazei, a fosfomonoesterazei acide și a proteinazelor s-a urmărit în semințele mature de mazăre, *Pisum sativum* (soiurile Hermonora și Bordy), și de bob, *Vicia faba* (soiul Minor). Aceste semințe provin de la plante dezvoltate din semințe tratate înainte de însămînțare, timp de 12 și 24 de ore, cu soluție saturată de metilclor. S-au testat două preparate de metilclor, unul tehnic și al doilea etalon, substanță pură. Drept martor au servit semințe de mazăre și de bob, imersate 12 sau 24 de ore în apă distilată. Însămînțarea semințelor astfel tratate și cultivarea plantelor dezvoltate din ele s-au realizat în cîmpul experimental al Grădinii Botanice din Iași, în anul 1978.

Activitatea α-amilazei s-a determinat în extractul apos (1), obținut din semințele de mazăre și bob, cu ajutorul metodei Noelting și Bernfeld (2). Activitatea fosfomonoesterazei acide în extractul obținut din semințe, cu soluție de NaCl 0,9%, s-a estimat după metoda cu β-glicerofosfat disodic ca substrat (3). Pentru determinarea activității proteinazelor din semințele plantelor studiate s-a folosit metoda Kunitz (4), adaptată de noi la condițiile concrete de lucru.

Rezultatele prezentate mai departe constituie media a 3—5 determinări și sînt exprimate în procente (%) față de martorul corespunzător, luat 100%.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cercetările noastre dovedesc că cele două preparate de metilclor influențează activitatea α-amilazei, a fosfomonoesterazei acide și a proteinazelor din semințele de mazăre și bob în mod diferit. Astfel, activitatea

α-amilazei (fig. 1, *A*) din semințele de mazăre, soiul *Hermonora*, este inhibată în proporție de 7,52—11,38 % de preparatul tehnic și de 2,72—10,61 % de preparatul etalon de metilclor, inhibarea fiind mai puternică după tratamentul de 12 ore al semințelor inițiale. La soiul Bordy, activitatea α-amilazei scade cu 6,11—19,45 % sub acțiunea preparatului tehnic și numai cu 5,49—6,42 % sub a celui etalon. În cazul ultimului soi de mazăre, diminuarea

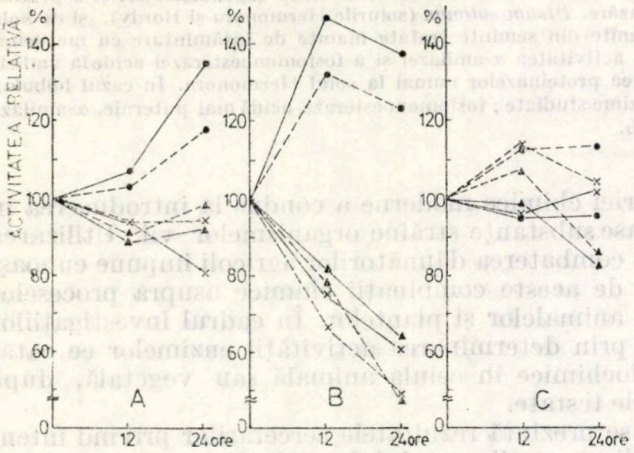


Fig. 1. — Activitatea relativă (%) a α-amilazei (*A*), fosfomonoesterazei acide (*B*) și proteinazelor (*C*) în semințele plantelor de mazăre, soiul Hermonora (▲) și soiul Bordy (x), și de bob, soiul Minor (●), după tratamentul cu preparatul tehnic (—) și cu preparatul etalon (— — —) de metilclor

mai accentuată a activității enzimei se asociază însă cu prelungirea tratamentului inițial la 24 de ore. Spre deosebire de mazăre, la bob, soiul Minor, activitatea α-amilazei este stimulată cu 7,30—35,38 % de preparatul tehnic de metilclor și cu 3,84—18,01 % de cel etalon, stimularea fiind mai intensă după tratamentul de 24 de ore.

Activitatea fosfomonoesterazei acide (fig. 1, *B*) se modifică în același sens cu cel observat pentru activitatea α-amilazei atît la mazăre, cît și la bob. Comparativ cu α-amilaza, inhibarea și stimularea activității fosfomonoesterazei acide sînt mai pronunțate. Inhibarea activității fosfomonoesterazei acide din semințele de mazăre este cuprinsă între 18,02 și 18,41 % pentru preparatul tehnic de metilclor și între 22,18 și 52,90 % pentru cel etalon, avînd aproximativ aceeași valoare la soiurile studiate. Activitatea fosfomonoesterazei acide din bob este de asemenea stimulată în urma tratamentului cu preparatul tehnic de metilclor (35,96—47,00 %) și, respectiv, cu preparatul etalon (23,52—32,83 %). Dacă inhibarea maximă a fosfomonoesterazei acide se constată după un contact al semințelor inițiale de mazăre de 24 de ore cu preparatele de metilclor, stimularea enzimei din bob este maximă în cazul tratamentului de 12 ore.

Influența preparatelor de metilclor asupra activității proteinazelor (fig. 1, *C*) din mazăre și bob este mai puțin diferențiată. Astfel, la soiul de mazăre Hermonora, activitatea proteinazelor nu este practic afectată de preparatul tehnic de metilclor dacă tratarea semințelor inițiale se continuă numai 12 ore. Cînd acțiunea aceluiași preparat se prelungește la 24 de ore, activitatea proteinazelor este inhibată cu 17,38 %. Preparatul etalon stimulează neînsemnat (6,34 %) și, respectiv, inhibă cu 14,36 % procesul de proteoliză. Activitatea proteinazelor în semințele soiului de mazăre Bordy este influențată neglijabil de preparatul tehnic, fiind ușor stimulată (5,18—13,79 %) de preparatul etalon de metilclor. În cazul soiului de bob

Minor, preparatul tehnic de metilclor determină o inhibare nesemnificativă (3,21—4,44 %) a proteolizei, în timp ce preparatul etalon stimulează ușor acest proces (12,91—13,54 %).

Datele obținute relevă că preparatele de metilclor influențează procesele enzimatice studiate în semințele plantelor de mazăre și bob într-un mod dependent, în general, de particularitățile genetice ale speciilor și chiar ale soiurilor respective. În cazul mazării, preparatul tehnic manifestă un efect inhibitor mai evident asupra α-amilazei și numai într-o anumită măsură și asupra proteinazelor, iar preparatul etalon asupra fosfomonoesterazei acide. La bob, preparatul tehnic produce o stimulare mai pregnantă a α-amilazei și a fosfomonoesterazei acide și o inhibare a proteinazelor, în timp ce preparatul etalon exercită o activare a celor trei enzime.

Modificarea proceselor de amiloliză , de hidroliză a esterilor organofosforici și de proteoliză la plantele tratate cu meticlor se poate explica prin acțiunea directă a pesticidului sau a produșilor lui de metabolizare (5) asupra activității enzimelor corespunzătoare, avînd în vedere faptul că pesticidele organoclorurate lasă reziduuri pe culturile tratate (6), se acumulează în organismele vii și au o persistență mare (7).

CONCLUZII

1. Intensitatea proceselor de amiloliză, hidroliză a esterilor organofosforici și proteoliză în semințele plantelor de mazăre și bob provenite din semințe tratate în primele momente ale germinării lor cu metilclor se modifică mai mult sau mai puțin pronunțat, în funcție de natura procesului respectiv, de specia de plantă și chiar soi și de durata de acțiune a pesticidului asupra semințelor inițiale.

2. Activitatea α-amilazei și fosfomonoesterazei acide este inhibată de metilclor la ambele soiuri de mazăre studiate, iar activitatea proteinazelor numai la soiul Hermonora și după tratamentul inițial de 24 de ore.

3. În cazul bobului, tratamentul pregerminatoriu cu metilclor determină stimularea celor trei enzime, care este mai accentuată la fosfomonoesteraza acidă și slabă la proteinaze.

Prezentat la redacție
la 5 aprilie 1985

Universitatea „Al. I. Cuza" Iași,
Disciplina de biochimie

THE ACTIVITY OF SOME HYDROLYTIC ENZYMES IN THE CULTURED PLANTS TREATED WITH METHYLCHLORINE

Summary

The intensity of amylolysis, organophosphoric ester hydrolysis and proteolysis was studied in the seeds of pea, *Pisum sativum* (Hermonora and Bordy types), and bean, *Vicia faba* (Minor type), obtained from seeds treated with methylchlorine (dimethyldiphenyltrichlorethane) before sowing. The methylchlorine preparations inhibit the amylase and acid phosphomonoesterase activity in both types of pea, while the proteinase activity only in the Hermonora type.

In the case of bean, methylchlorine activates all the three studied enzymes : acid phosphomonoesterase (strong), α-amylase (moderately) and proteinases (only weakly).

BIBLIOGRAFIE

1. VL. ARTENIE, Travaux de la Station „Stejarul", Ecologie Terrestre et Génétique, **63** (1976–1977).
2. G. NOELTING, P. BERNFELD, Helv. Chim. Acta, **31**, 286 (1948).
3. VL. ARTENIE, ELVIRA TĂNASE, *Practicum de biochimie generală*, litografiat, Universitatea „Al. I. Cuza", Iași, 1981, p. 110.
4. M. KUNITZ, J. Gen. Physiol, **30**, 291 (1947).
5. E. K. WEISBURGER, Mol. Cell. Biochem., **32**, 95 (1980).
6. ADELA ȘTEFAN, *Biochimia insecticidelor și fungicidelor. Efectele lor asupra organismelor vii*, litografiat, Universitatea din București, 1972, p. 60.
7. W. R. BRIGGES, Trans. An. Fish Soc., **92**, 421 (1963).

FUNCȚII BIOLOGICE ALE LECTINELOR ÎN ORGANISME ANIMALE

JUNONA COLCEAG

Introducere

I. VERTEBRATE

1. Rolul lectinelor în procesul de pinocitoză la nivelul ficatului
2. Semnificații biologice ale lectinelor limfocitare
3. Lectinele plachetelor sanguine, mediatori ai reacțiilor de adeziune celulară
4. Activitate lectinică asociată eritrocitelor
5. Proteine plasmatice cu proprietăți de lectină, caracteristice fazei acute în inflamații
6. Rolul lectinelor la nivelul sistemului nervos în reacțiile de recunoaștere celulară
7. Lectine implicate în procesele de diferențiere celulară

II. NEVERTEBRATE

1. Semnificații imunologice ale lectinelor serice
2. Rolul lectinelor de la suprafața hemocitelor în reacțiile de apărare

INTRODUCERE

Fenomenul de recunoaștere, caracteristic tuturor celulelor vii organizate în țesuturi, constituie astăzi o temă centrală a biologiei. La nivel molecular, specificitatea de reacție este o caracteristică a tuturor proceselor biologice (1). Cunoașterea mecanismelor fine de recunoaștere de la diferite nivele ale unui organism viu va conduce la o imagine calitativ nouă a interdependențelor multiple dintre diferitele structuri ale acestui organism.

În ultimii 10 ani s-au făcut progrese în descifrarea mecanismelor de recunoaștere bazate pe structuri glucidice. Această nouă linie de investigație a apărut ca urmare a cercetărilor intense privind distribuția, structura, proprietățile biochimice și posibilele implicații biologice ale lectinelor. Deși la origine termenul de „lectină" desemna „fitohemaglutininele", descoperirea de molecule similare la nevertebrate și după aceea la vertebrate a condus la redefinirea sa. Astfel, lectinele sînt proteine sau glicoproteine de origine neimună, care recunosc și se leagă specific de structuri glucidice și care aglutinează celulele și/sau precipită glicoconjugate (2).

Datorită proprietăților lor de a se lega specific structuri glucidice și prezenței lor atît la procariote cît și la eucariote, lectinelor le-au fost atribuite funcții de recunoaștere. Aceste funcții includ implicarea lectinelor în interacțiuni cu celule sau glicoconjugate extracelulare aparținînd aceluiași organism (recunoașterea „self"-ului) și interacțiuni cu structuri moleculare sau celule străine sau cu glicoconjugate și celule ale aceluiași organism modificate (recunoașterea „non-self"-ului) (3).

St. cerc. biochim., 28, 2, 159–171 (1985)

1. ROLUL LECTINELOR ÎN PROCESUL DE PINOCITOZĂ LA NIVELUL FICATULUI

Cercetările cu privire la rolul celulelor hepatice de iepure în procesul de pinocitoză al asialoglicoproteinelor din plasmă au condus la izolarea „proteinei Ashwell", care constituie una din primele lectine animale cunoscute (4), (5). Lectina, cu specificitate pentru galactoză/N-acetilgalactozamină, a fost purificată din pudră acetonică de ficat de iepure, prin cromatografie de afinitate pe asialoorosomucoid imobilizat pe Sepharose 4B (6), (7), (8). Lectine similare, cu aceeași specificitate de glucid, au fost descoperite ulterior și la nivelul hepatocitelor de șobolan (9), (10) și de om (11), (12). Aceste lectine specifice pentru galactoză/N-acetilgalactozamină recunosc asialoglicoproteinele serice și le captează din ser, îndepărtîndu-le din circulație (glicoproteinele prin îmbătrînire pierd acidul sialic terminal, expunînd în această poziție galactoză).

Semnificația biologică a recunoașterii N-acetilgalactozaminei de către lectina hepatică umană și de lectina hepatică de iepure nu este încă clară deoarece acest glucid se găsește foarte rar în poziție finală la glicoproteinele circulante. Faptul că, dimpotrivă, N-acetilgalactozamina reprezintă un component comun al glicoproteinelor membranare ar putea sugera că lectina hepatică este implicată în interacțiunile celulă-celulă pe baza recunoașterii acestui glucid (11).

O dovadă de necontestat a faptului că lectinele de la nivelul hepatocitelor mediază îndepărtarea din circulație a glicoproteinelor parțial degradate, care expun terminal galactoză, a fost adusă în 1980 de Stockert și colab. (13), care au infuzat anticorpi IgG antilectină sau anticorpi IgG (control) în vena portală a unui ficat de șobolan izolat, înainte de a injecta asialoorosomucoid și bilirubină marcate. Anticorpii IgG antilectină au redus rata captării asicaloorosomucoidului de către ficat cu 80%, fără să afecteze captarea bilirubinei. Blocajul a durat cel puțin 90 min după infuzia cu anticorpi, ceea ce ar sugera că în timpul acestei perioade nu are loc o revenire semnificativă a lectinei funcționale de la suprafața hepatocitului.

Deși lectina din ficat își exercită funcția biologică la suprafața membranei plasmatice, doar 5 % (7×10^4 molecule/hepatocit) se află la acest nivel (14). Aproximativ 95 % din cantitatea de lectină (hepatocit de șobolan) este localizată intracelular (14) în asociere cu complexul Golgi, cu microzomii și cu lizozomii (15). De asemenea, cercetările efectuate pe ficat de șobolan au arătat că, aparent, lectina nu este consumată în procesul de îndepărtare a glicoproteinelor serice. Timpul ei de înjumătățire este de aproximativ 88 de ore, fiind cu cîteva ordine de mărime mai mare decît rata de degradare a glicoproteinelor serice captate de ficat pentru distrugere (15). Mai mult, rata de degradare a lectinei nu a crescut prin administrarea unor cantități exogene mari de asialoorosomucoid.

Aceste studii sugerează că lectina de la nivelul membranei plasmatice este regenerată în forma activă printr-un mecanism necunoscut (16). Cercetări foarte recente au urmărit să descifreze etapele ulterioare internalizării complexului ligand — receptor (asialoglicoproteină/lectină) pentru a putea răspunde cînd și cum are loc procesul de disociere dintre ligand (care este degradat) și receptor (care este reutilizat) și pe ce cale este reciclat receptorul la suprafață (17). Bridges și colab. (18) găsesc că ligandul

se disociază de receptor destul de rapid după internalizare, în timp ce datele obținute de Genze și colab. (19) sugerează că procesul poate avea loc mai tîrziu. Studii complexe efectuate pe hepatocite izolate în suspensie sau pe culturi primare în monostrat au relevat noi aspecte (20). După internalizarea complexului ligand-receptor, ligandul rămîne atașat la receptor în timpul mișcării sale în interiorul celulei. După aceea, are loc disocierea complexului, ligandul fiind degradat la nivelul lizozomilor, iar receptorul fiind reutilizat la nivelul membranei plasmatice.

Pornind de la faptul că interacțiunea asialoglicoproteine/lectină este dependentă de pH (o scădere a pH-ului în mediu constituie un mecanism potențial al disocierii intracelulare a complexului) (21) și de la proprietatea bazelor slabe, difuzibile, de a crește pH-ul lizozomilor (22), Harford și colab. (20) au urmărit efectul clorurii de amoniu asupra evoluției endocitozei asialoglicoproteinelor în culturi de hepatocite în monostrat. Pentru comparație s-a studiat efectul unui al doilea agent, leupeptina (tripeptid bacterian, inhibitor al serin- și tiolproteazelor), care este de așteptat să blocheze degradarea ligandului numai după ce ligandul liber a atins lizozomii. Amîndoi inhibitorii au blocat procesul de degradare a ligandului, acționînd însă la momente diferite. Astfel, clorura de amoniu blochează disocierea complexului receptor-ligand, ceea ce sugerează că în procesul de disociere pot fi implicate modificări de pH. Pe de altă parte, în timp ce tratamentul cu clorură de amoniu a condus la acumularea ligandului în fracțiunile prelizozomale, expunerea celulelor la leupeptină a dus la acumularea ligandului în lizozomi. Aceste rezultate indică faptul că procesul de disociere a complexului ligand-receptor mediat de pH are loc în vezicule endocitare nelizozomale. În figura 1 este redat schematic procesul endocitozei mediate de receptor.

În afară de lectinele hepatocitelor cu specificitate pentru galactoză/N-acetilgalactozamină, lectine răspunzătoare de îndepărtarea rapidă din circulație a glicoproteinelor cu galactoză în poziție terminală, au mai fost identificate și izolate de la nivelul ficatului (la iepure, șobolan, om) lectine cu specificitate pentru manoză/N-acetilglucozamină. Aceste lectine, care mediază îndepărtarea din circulație a glicoproteinelor parțial degradate

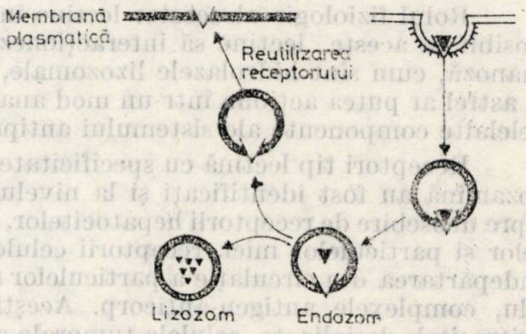


Fig. 1. — Reprezentarea grafică a endocitozei și a catabolismului asialoglicoproteinelor (20).

ce expun terminal manoză/N-acetilglucozamină, se află situate la nivelul membranei plasmatice a celulelor sinusoidale (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29) și în special a celulelor hepatice endoteliale (30). Captarea glicoproteinelor terminate în N-acetilglucozamină de către celulele endoteliale este puternic inhibată de glucoză atunci cînd acest glucid este prezent în concentrații similare cu cele întîlnite în serul bolnavilor de diabetus mellitus (30).

Relevant este faptul că ficatul de pasăre, care conține numai lectină cu specificitate pentru N-acetilglucozamină, captează din ser numai glicoproteinele parțial degradate, care expun terminal N-acetilglucozamină (31), (32).

Deci, supraviețuirea glicoproteinelor în circulație este dependentă de glucidul nereducător din poziția finală a regiunii oligozaharidice. Glicoproteinele cu acid sialic la extremitate au un timp de înjumătățire de cîteva zile (la om), în timp ce glicoproteinele terminate în galactoză sau în manoză/N-acetilglucozamină sînt rapid îndepărtate din circulație prin mecanismele amintite mai înainte.

Pe de altă parte, au fost identificați în serul uman inhibitori ai legării glicoproteinelor terminate în galactoză și glicoproteinelor terminate în manoză/N-acetilglucozamină de lectinele hepatice specifice (corespunzătoare). În primul caz, acești inhibitori sînt reprezentați de o populație heterogenă de glicoproteine desializate (33). Studii recente au demonstrat că principalul inhibitor este IgA_1 și că IgA polimer are o capacitate de inhibiție cu un ordin de mărime mai mare decît monomerul (34), (35).

Bolnavii suferind de dereglări sau leziuni hepatice constituie un model în care aceste interacțiuni dintre lectine și glicoconjugate pot fi perturbate. Astfel, în timp ce plasma subiecților normali conține cantități neglijabile de asialoglicoproteine, la cirotici s-a pus în evidență o creștere anormală a asialoglicoproteinelor circulante (36), (37), (38) și în particular o desializare de 20—50 % a orosomucoidului (39). De asemenea, în serul pacienților cu ciroză s-au evidențiat concentrații ridicate de IgA polimer. Semnificația nivelelor ridicate de IgA polimer și de glicoproteine desializate în serul pacienților cu maladii hepatice nu este încă înțeleasă, deși au fost formulate mai multe ipoteze privind fie posibile alterări structurale ale membranei plasmatice a hepatocitului, fie defecte funcționale la nivelul procesului de reciclare a receptorului.

Recent s-au identificat în serul uman (40) și de iepure (41) lectine specifice pentru manoză/N-acetilglucozamină, care inhibă, in vitro, captarea glicoproteinelor terminate în manoză/N-acetilglucozamină de către celulele hepatice sinusoidale de șobolan.

Rolul fiziologic al acestor lectine în ser nu este încă clarificat. Este posibil ca aceste lectine să interacționeze cu enzime toxice terminate în manoză, cum sînt hidrolazele lizozomale, care pot scăpa din celule în ser și astfel ar putea acționa într-un mod analog cu α_1-tripsin-inhibitorul și cu celelalte componente ale sistemului antiproteazic din ser (40).

Receptori tip lectină cu specificitate pentru galactoză/ N-acetilgalactozamină au fost identificați și la nivelul celulelor Kupffer (42), (43). Spre deosebire de receptorii hepatocitelor, care mediază endocitoza moleculelor și particulelor mici, receptorii celulelor Kupffer sînt responsabili de îndepărtarea din circulație a particulelor multivalente, cum sînt, de exemplu, complexele antigen-anticorp. Acești receptori tip lectină recunosc eritrocitele desializate, celulele tumorale aflate în circulație, fiind deci implicați în fagocitarea eritrocitelor îmbătrînite de către celulele Kupffer și în formarea metastazelor la nivelul ficatului (42), (44). Aceste lectine par de asemenea implicate în reținerea la nivelul ficatului a limfocitelor desializate (42). Studiile efectuate in vitro cu macrofage peritoneale de șobolan au arătat că singurul factor decisiv în legarea și în fagocitarea eritrocitelor tratate cu sialidază este cantitatea de acid sialic eliberată, demonstrînd clar implicarea lectinei specifice pentru galactoză în acest proces (45).

Prezența serului determină creșterea ratei de legare și fagocitare. Natura și mecanismul de acțiune al factorilor răspunzători nu sînt încă cunoscute (45).

Toate aceste date demonstrează că lectinele intervin în funcțiile hepatice de recunoaștere a glicoconjugatelor, a căror structură a fost modificată patologic sau prin îmbătrînire.

2. SEMNIFICAȚII BIOLOGICE ALE LECTINELOR LIMFOCITARE

Fenomenul rozetării dintre limfocitele T umane și eritrocitele de oaie a fost interpretat ca fiind interacțiunea dintre o lectină limfocitară și un glicolipid de la nivelul eritrocitului (46), stimulînd cercetările în această direcție. Dacă limfocitele T sînt tratate cu un polizaharid complex (PWCH — polizaharid extras din rădăcini de *Phytolacca americana*), atunci o parte din ele aglutinează, putînd să fie ulterior eliberate prin adăugarea de α-metil-manozid (47). Se obține o populație de limfocite îmbogățită în limfocite T supresoare. Factorul supresor produs de aceste limfocite este inhibat de 6-dezoximanoză (47). Aceste rezultate se corelează cu observații anterioare, care arătau că funcția limfocitului T supresor este selectiv îmbibată de un metilmanozid (48) și că factorul supresor implicat în interacțiunea dintre limfocitul T supresor și limfocitele T și B este o proteină membranară cu activitate lectinică.

O specificitate diferită și cu un spectru mai larg a fost pusă în evidență (49), (50) în cazul reacțiilor de citotoxicitate spontană mediate celular. Aceste reacții sînt inhibate de D-riboză, gențiobioză, N-acetilgalactozamină și lactoză. Efectul inhibitor al acestor glucide nu a fost evidențiat și pentru reacțiile de citotoxicitate anticorp-dependente. Aceste date sugerează că activitatea celulelor NK (Natural Killer), dar nu și a limfocitelor K, este dependentă de o lectină endogenă capabilă să interacționeze cu lanțurile glucidice de la suprafața celulelor-țintă.

3. LECTINELE PLACHETELOR SANGUINE, MEDIATORI AI REACȚIILOR DE ADEZIUNE CELULARĂ

Plachetele sanguine umane sînt specializate în cel puțin două tipuri de reacții de adeziune celulară : agregarea plachetă-plachetă și aderarea plachetelor la colagen. În fiecare din aceste tipuri de reacție sînt implicate lectine.

În 1977, Gartner și colab., (51) au descris o lectină endogenă la nivelul plachetelor sanguine umane. Lectina aglutinează eritrocitele umane după fixare cu formaldehidă. In vivo, lectina mediază interacțiunile plachetă-plachetă, care conduc la agregare, după ce plachetele sanguine au fost activate de trombină (52). Activitatea lectinei este inhibată de galactozamină, glucozamină și manozamină. Această lectină endogenă a fost identificată cu trombospondina, iar manifestarea activității ei este dependentă de secreția unor compuși a căror natură nu a fost încă determinată (53).

Aceiași autori (53) au arătat că are loc și o secreție de lectină, care este responsabilă de agregarea plachetelor sanguine activate de trombină. Astfel, folosirea plachetelor sanguine fixate, care și-au pierdut activitatea aglutinantă, conservîndu-și funcția de receptor, conduce la creșterea aglutinării. Plachetele sanguine lipsite de fibrinogen nu sînt aglutinabile, ceea ce suge-

sează că fibrinogenul este receptorul acestei lectine secretate de plachetele ranguine activate (54).

Interacțiunea plachetă—plachetă poate să fie de asemenea mediată de fibronectina de la nivelul membranei plachetelor sanguine (55). Pe de altă parte, adeziunea plachetelor sanguine la colagenul nativ se pare că este mediată direct de o lectină de suprafață, denumită factorul de adeziune la colagen (56).

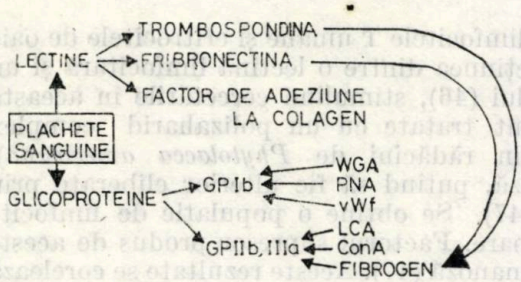


Fig. 2. — Reprezentarea grafică a relațiilor posibile dintre lectinele și glicoproteinele de la suprafața plachetelor sanguine (57), (58) : WGA — lectina din germeni de grîu ; PNA — lectina din alune ; LCA — lectina din linte ; ConA— concanavalina A ; vWf — factorul Von Willebrand.

În figura 2 sînt reprezentate schematic ipotezele privind relațiile dintre lectine și glicoproteinele de la nivelul membranei plachetelor sanguine, relații implicate în reacțiile de adeziune celulară. Glicoproteinele GP IIb și GP IIIa par să fie receptorii pentru fibrinogen, el însuși receptor pentru trombospondină și fibronectină (57), (58). Glicoproteina I b este receptorul unei alte proteine care prezintă activitate lectinică : factorul Von Willebrand (vWf) (59). Factorul Von Willebrand se află localizat în granule α ale plachetelor sanguine (60), de unde este eliberat după stimularea dată de trombină (61). El este responsabil de adeziunea plachetelor sanguine la componentele subendoteliului (62), (63). Activitatea aglutinantă este inhibată de hexozamine, de manoză și de aminoacizi cu sarcină pozitivă (39).

4. ACTIVITATE LECTINICĂ ASOCIATĂ ERITROCITELOR

Glicoferina constituie principala glicoproteină membranară a eritrocitului uman. Solubilizată, glicoferina aglutinează eritrocitele umane tripsinizate (64), reacția fiind inhibată de N-acetilgalactozamină.

Semnificația biologică a proprietății de lectină a glicoferinei este în curs de investigație (65).

5. PROTEINE PLASMATICE CU PROPRIETĂȚI DE LECTINĂ, CARACTERISTICE FAZEI ACUTE ÎN INFLAMAȚII

În cursul unui proces inflamator are loc o creștere puternică a concentrației unor proteine plasmatice, denumite generic „proteine ale fazei acute" (APP — „acute phase proteins") (66). Sinteza are loc mai ales la nivelul ficatului, dar în unele cazuri și la nivelul fibroblastelor și macrofagelor (66), (67), și este indusă de o monokină (interleukina 1), produsă de macrofage.

Proteina C-reactivă (CRP) este caracteristică fazei acute. Concentrația sa normală ($<0{,}1$ mg/l) este puternic crescută (1000 $\times$) în cursu

fenomenelor inflamatorii (67). CRP umană este o pentraxină, cu greutatea moleculară de 105 000 D, compusă din subunităţi identice aranjate într-o simetrie ciclică. Studii recente au demonstrat că CRP este o lectină cu specificitate pentru structuri glucidice ce conţin galactoză şi pentru fosfocolină. Activitatea lectinei este dependentă de calciu (68). In vivo, CRP complexată sau agregată activează complementul pe calea clasică, formînd un complex cu C3b. Studii efectuate in vitro sugerează că CRP intervine în reglarea procesului inflamator, în promovarea fagocitozei, în inhibarea agregării plachetelor şi în eliberarea mediatorilor de către limfocite. De asemenea, CRP se leagă puternic de *Streptomyces pneumoniae*, care conţine un polizaharid în a cărui structură intră fosfocolină (69). Administrarea pasivă de CRP umană la şoareci îi protejează complet de infecţii letale cu *Streptomyces pneumoniae* (70) (71), ceea ce ar sugera implicarea lectinei în mecanismele de apărare ale organismului faţă de infecţii.

Componentul seric amiloid P (serum amyloid P—SAP) este o glicoproteină plasmatică ce face parte din grupul pentraxinelor, ca şi CRP. SAP prezintă o afinitate crescută pentru agaroză (68) şi o slabă afinitate pentru fosfocolină. Recent, Hind şi colab. au demonstrat că SAP umană este o lectină cu specificitate pentru 4,6-piruvat-acetalul galactozei (72). Activitatea lectinei este dependentă de Ca. Aceiaşi autori, încercînd să găsească o semnificaţie biologică a afinităţii SAP pentru 4,6-piruvat-acetalul galactozei, au studiat capacitatea SAP de a se lega de microorganisme, ştiut fiind că unele microorganisme, printre care şi bacterii de importanţă clinică, conţin acest glucid la nivelul peretelui celular (73). Aceasta cu atît mai mult cu cît galactozidul nu a fost identificat în ţesuturile mamiferelor şi deci este improbabil ca interacţiunea cu el să prezinte semnificaţie fiziologică. Rezultatele sînt relevante, SAP prezentînd in vitro afinitate pentru *Klebsiella rhinoscleromatis* şi pentru *Streptococcus pyogenes* (74). Este deci posibil ca lectina să fie implicată în mecanismele de apărare neimune ale organismului.

Fibronectina. Sub numele de fibronectine sînt desemnate o serie de glicoproteine prezente în fluidele extracelulare sau la suprafaţa a diferite celule. Multiplele lor interacţiuni cu alte substanţe (colagen, gelatină, heparină, proteoglicani, fibrină/fibrinogen) şi cu diferite structuri ale suprafeţelor celulare îndeplinesc diferite roluri în numeroase activităţi biologice (75). Formele moleculare cele mai bine cunoscute sînt fibronectina umană din plasma sanguină şi fibronectina eliberată de fibroblaste de embrion de pui de găină în cultură. Fibronectina celulară şi cea plasmatică aglutinează eritrocitele de oaie sensibilizate (76), (77). Activitatea celor două lectine poate fi inhibată de hexozamine (tabela 1).

Tabela 1

Activitatea aglutinantă a fibronectinei plasmatice şi a fibronectinei celulare

Fibronectina	Celule aglutinante	Specificitate
CSP (fibroblast de embrion de pui de găină)	eritrocite de oaie formolizate	aminozaharuri
CIG (plasma sanguină umană)	eritrocite de oaie tripsinizate şi formolizate	glucoză
	eritrocite de iepure tripsinizate	fucoză, N-acetil-galactozamină

În timpul procesului inflamator, fibronectina plasmatică se găsește la locul infecției, unde migrează monocitele și macrofagele (78), fiind implicată în reglarea activității fagocitare. Ea este capabilă să opsonizeze colagenul alterat. Complexul fibronectină-colagen este recunoscut apoi de un receptor al macrofagelor mononucleare și îndepărtat din circulație.

In vitro, legarea fibronectinei de colagen poate fi modificată de unele glucide (79), iar complexele fibronectină-gelatină pot fi disociate de glucoză (76). Recent au fost studiate interacțiunile dintre fibronectina plasmatică și biomateriale care conțin arginină (80).

Macrofagele sintetizează și secretă o formă moleculară de fibronectină, glicoproteina α_2, similară cu fibronectina plasmatică umană (81), care este implicată în opsonizarea complexului fibrină-fibrinogen (82).

6. ROLUL LECTINELOR LA NIVELUL SISTEMULUI NERVOS ÎN REACȚIILE DE RECUNOAȘTERE CELULARĂ

Recent s-a observat că extractele de creier de la diferite specii induc, in vitro, proliferarea celulelor nervoase (83). Extractele de creier de șobolan adult adăugate în mediu de cultură determină o creștere a proceselor de reasociere și grupare în mănunchiuri, în cazul celulelor embrionare de șoarece. Aceste observații au condus la căutarea lectinelor, care par a fi implicate în aceste procese de agregare (84). S-a găsit că extractul de creier de șobolan prezintă activitate hemaglutinantă, care este inhibată specific de galactozamină și lactoză. Extractul fără lectină (aceasta a fost reținută afin pe lactogel) nu mai produce reasocierea celulelor, ceea ce indică faptul că interacțiunile directe sau indirecte ale lectinei specifice pentru lactoză, cu situsurile corespunzătoare de la nivelul membranelor celulare, sînt responsabile de această agregare celulară.

În 1984, Zanetta și colab. (85) demonstrează prezența de lectine cu specificitate pentru glicanii bogați în manoză la nivelul cerebelului de șobolan. Aceste lectine ar putea fi implicate în reacțiile de recunoaștere în cursul procesului de sinaptogeneză.

Celulele de neuroblastom la șoarece conțin la suprafață o lectină specifică pentru lactoză (86), care intervine în formarea de agregate celulare mari atunci cînd aceste celule sînt cultivate în vitro. Semnificația biologică a activității sale în vivo nu este cunoscută.

7. LECTINE IMPLICATE ÎN PROCESELE DE DIFERENȚIERE CELULARĂ

Ipoteza privind rolul pe care aceste lectine l-ar putea avea în procesele de diferențiere a țesuturilor la vertebrate a stimulat studiile privind identificarea și evaluarea funcțională a lectinelor la nivelul țesuturilor musculare. Această ipoteză a fost sugerată de faptul că lectinele respective se află în cantități relativ mari într-un anumit stadiu de dezvoltare a unui țesut, pentru ca apoi să dispară în țesutul matur. Mai mult, aceeași lectină, care era caracteristică unui țesut în cursul procesului de dezvoltare, este localizată în alt țesut la adult, ceea ce sugerează că aceeași lectină poate avea funcții biologice diferite (87).

Astfel, studiile efectuate în diferite țesuturi ale puiului de găină au condus la identificarea a două lectine, notate CLL_I („chicken lactose lectin" I) și CLL_{II} („chicken lactose lectin" II). Deși cele două lectine au

aceeași specificitate de glucid (lactoză), sînt deosebite din punctul de vedere al greutății moleculare, al secvenței peptidice și al punctului izoelectric(87).

CLL_I se află în cantități relativ mari în mușchiul pectoral al embrionului de pui de găină de 16 zile, după care are loc o scădere pînă la concentrații foarte mici în mușchiul adult (88). Lectina este localizată predominant intracelular, deși a putut fi detectată și la suprafața mioblaștilor în cultură (89), (90).

Creșterea intracelulară a cantității de lectină în mioblaști se corelează cu fuziunea acestor celule pentru a forma miotubuli polinucleați, ceea ce a sugerat că lectina participă în acest proces. Studiile de blocare a fuziunii mioblaștilor (șobolan, pui de găină) în cultură cu inhibitorul specific al CLL_I (tiodigalactozid) au condus la rezultate contradictorii, rolul specific al acestei lectine în fuziunea mioblaștilor nefiind încă stabilit (91), (92).

La adult, CLL_I se află localizată în cantitate relativ mare la nivelul celulelor hepatice sinusoidale (intracelular) și în spațiile extracelulare în pancreas (93). Semnificația biologică a acestor lectine este în curs de investigație.

În stadiul de embrion, CLL_{II} se află în cantități foarte mici în mușchi și creier, fiind prezentă în cantități mari în ficat și rinichi. Nivelul crescut de lectină în ficatul și rinichiul embrionului scade puternic la adult (87). La adult, lectina se află în concentrații mari la nivelul intestinului, fiind localizată în granulele secretoare ale celulelor intestinale alături de mucină. care este de altfel un inhibitor al lectinei. Aceste date sugerează că lectina este implicată în secreția mucinei de către celule în lumenul intestinal (87).

II. NEVERTEBRATE

Lectinele din hemolimfă reprezintă principalul grup de lectine la nevertebrate și aparțin categoriei pentraxinelor. Au fost identificate și alte lectine asociate organelor sexuale, glandelor secretoare și pontei moluștelor (94).

Rolul biologic al lectinelor la nevertebrate nu este încă elucidat, deși pe marginea acestui subiect s-au făcut multe speculații. Din studiile efectuate pînă în prezent rezultă că lectinele nevertebratelor sînt implicate în recunoașterea „non-self"-ului, etapă cheie a mecanismelor de apărare.

1. SEMNIFICAȚII IMUNOLOGICE ALE LECTINELOR SERICE

Lectinele serice au o răspîndire generală la nevertebrate (95), (96). Deoarece nevertebratele nu posedă imunoglobuline, numeroase studii recente au încercat să demonstreze că lectinele serice sînt înrudite funcțional cu acestea. Astfel, mai mulți cercetători au sugerat, pe baza rezultatelor obținute, că lectinele din serul nevertebratelor pot funcționa ca opsonine (97), (98), (99). Figura 3 prezintă o schemă posibilă a procesului de opsonizare (100). Dacă lectinele serice la nevertebrate ar funcționa într-adevăr ca opsoninele de la vertebrate, atunci glucidul pentru care este specifică lectina ar trebui să fie situat atît pe suprafața granulocitului, cît și pe suprafața particulei străine (100).

Subiectul este încă controversat, deoarece hemocitele de la moluște par să recunoască materialele străine în absența lectinelor din ser (101).

Studii intense asupra cheliceratelor, în special asupra merostomatelor și arahnidelor, au demonstrat că toate speciile cercetate posedă lectine serice specifice pentru acidul sialic (102), (103), (104), Deoarece acidul

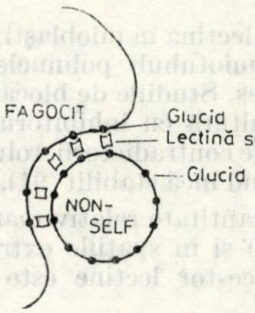


Fig. 3. — Reprezentarea grafică a pozițiilor lectinelor și structurilor glucidice care ar facilita opsonizarea (100).

sialic nu este prezent la artropode, acestor lectine li s-au atribuit funcții de recunoaștere a „non-self"-ului. Pe de altă parte, foarte puține bacterii, virusuri și protozoare parazite au acid sialic, ceea ce ar constitui un contraargument al rolului de apărare al lectinelor cheliceratelor. Totuși, recent s-a demonstrat că aceste lectine prezintă afinitate și pentru alte glucide, cum sînt N-acetilglucozamina, N-acetilgalactozamina, galactoza, acidul glucuronic, acidul colominic, 2-keto-3-deoxioctonatul, toate substanțe prezente în peretele celular bacterian (104).

Această specificitate multiplă sugerează că lectinele serice pot funcționa ca un sistem de recunoaștere a particulelor străine, bazat pe structuri glucidice (105). Lectine cu specificități similare au fost găsite și la crustaceele *Birgus latro* (105), *Macrobrachium rosenbergii* (106) și *Callinectes sapidus* (107).

Studiile efectuate pe crabul *Seylla serrata* arată că lectinele serice ale acestuia contribuie la o îndepărtare mai rapidă a particulelor străine din circulație (108). Una din lectine este specifică pentru acidul O-acetilsialic, iar cealaltă recunoaște grupările N-acetil ale acidului N-acetilneuraminic și ale N-acetilglucozaminei. Prima lectină favorizează îndepărtarea din ser mai rapidă a bacteriilor Gram-negative, al căror glicocalix conține acid O-acetilsialic, iar cea de-a doua se pare că participă la stocarea și transportul N-acetilglucozaminei în timpul procesului de formare a chitinei (108).

2. ROLUL LECTINELOR DE LA SUPRAFAȚA HEMOCITELOR ÎN REACȚIILE DE APĂRARE

Hemocitele nevertebratelor participă într-o serie de mecanisme de apărare, incluzînd fagocitoza, încapsularea, coagularea hemolimfei, eliberarea de fenoloxidază și melanizarea.

Recent s-a demonstrat că, la unele specii de moluște, artropode și tunicate, hemocitele prezintă la suprafața lor lectine (99), (107), (109), (110), (111), ceea ce a sugerat că aceste lectine sînt implicate în recunoașterea și legarea moleculelor și particulelor străine de către hemocite.

Au fost imaginate mai multe modele de acțiune a lectinelor la acest nivel (100), (111), dar mai sînt necesare studii pentru elucidarea funcțiilor lor.

Prezentat la redacție
la 15 mai 1985

Institutul de științe biologice
București, Splaiul Independenței nr. 296

BIBLIOGRAFIE

1. T. C. FLETCHER, A. COOPER-WILLIS, în *The Reticuloendothelial System*, sub red. N. COHEN, M. M. SIEGEL, Plenum Publ. Corp., New York, 1982, p. 141.
2. I. J. GOLDSTEIN, R. COLLIN HUGHES, M. MONSIGNY, T. OSAWA, N. SHARON, Nature, **285**, 66 (1980).
3. G. R. VASTA, J. J. MARCHALONIS, în *Recognition Proteins, Receptors and Probes: Invertebrates*, sub red. E. COHEN, Alan R. Liss, Inc., New York., 1984, p. 125.
4. G. ASHWELL, A. G. MORELL, Adv. Enzymol., **41**, 99 (1974).
5. E. F. NEUFELD, G. ASHWELL, în *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, sub red. W. LENNARZ, Plenum, New York, 1980, p. 241.
6. R. L. HUDGIN, W. E. PRICER Jr., G. ASHWELL, R. J. STOCKERT, A. G. MORELL, J. Biol. Chem., **249**, 5536 (1974).
7. T. KAWASAKI, G. ASHWELL, J. Biol. Chem., **251**, 1296 (1976).
8. R. J. STOCKERT, A. G. MORELL, I. H. SCHEINBERG, Science, **186**, 365 (1974).
9. P. H. WEIGEL, E. SCHMELL, Y. C. LEE, S. ROSEMAN, J. Biol. Chem., **253**, 330 (1978).
10. J. SCHLEPPER-SCHAFFER, E. FRIEDRICH, H. KOLB, Eur. J. Cell Biol., **25**, 95 (1981).
11. J. U. BAENZIGER, Y. MAYNARD, J. Biol. Chem., **255**, 4607 (1980).
12. A. L. SCHWARTZ, S. E. FRIDOVICH, B. B. KNOWLES, H. F. LODISH, J. Biol., Chem., **256**, 8878 (1981).
13. R. J. STOCKERT, U. GARTNER, A. G. MORELL, A. W. WOLKOFF, J. Biol. Chem., **255**, 3830 (1980).
14. C. Y. STEER, G. ASHWELL, J. Biol. Chem., **255**, 5008 (1980).
15. T. TANABE, W. E. PRICER, Jr., G. ASHWELL, J. Biol. Chem., **254**, 1038 (1979).
16. S. H. BARONDES, Ann. Rev. Biochem., **50**, 207 (1981).
17. A. L. HUBBARD, D. A. WALL, W. A. DUNN, în *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red., H. POPPER, MTP Press Limited, 1983, p. 265.
18. K. BRIDGES, J. HARFORD, G. ASHWELL, R. A. KLAUSNER, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **79**, 350 (1981).
19. H. J. GENZE, J. W. HOT, G. J. A. M. STONS, H. F. LODISH, A. L. SCHWARTZ, Cell, **32**, 277 (1983).
20. J. HARFORD, R. D. KLAUSNER, K. BRIDGES, G. ASHWELL, în *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red., H. POPPER, MTP Press Limited, 1983, p. 259.
21. R. L. HUDGIN, W. E. PRICER, G. ASHWELL, R. J. STOCKERT, A. G. MORELL, J. Biol. Chem., **249**, 5536 (1974).
22. A. ROSS, W. BORON, Physiol. Rev., **61**, 296 (1981).
23. T. KAWASAKI, R. ETOH, I. YAMASHINA, Biochem. Biophys. Res. Commun., **81**, 1018 (1978).
24. D. T. ACHORD, F. E. BROT, C. E. BELL, W. S. SLY, Cell, **15**, 269 (1978).
25. T. L. BROWN, L. A. HENDERSON, S. R. THORPE, J. W. BAYNES, Arch. Biochem. Biophys., **118**, 418 (1978).
26. P. H. SCHLESINGER, T. W. DOEBLER, B. F. MANDELL, R. WHITE, C. De SCHRYVER, J. S. RODMAN, M. J. MILLER, P. STAHL, Biochem. J., **116**, 103 (1978).
27. C. J. STEER, R. CLARENBURG, J. Biol. Chem., **254**, 4457 (1979).
28. C. J. STEER, J. W. KUSIAK, R. O. BRADY, E. A. JONES, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **76**, 2774 (1979).
29. P. H. SCHELSINGER, J. S. RODMAN, T. W. DOEBLER, P. D. STAHL, Y. C. LEE, C. P. STOWELL, T. B. KUHLENSCHMIDT, Biochem. J., **192**, 597 (1980).
30. E. JONES, J. VERGALLA, J. A. SUMMERFIELD, în *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red., H. POPPER, MTP Press Limited, 1983, p. 287.
31. J. LUNNEY, G. ASHWELL, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **73**, 341 (1976).
32. T. KAWASAKI, G. ASHWELL, J. Biol. Chem., **252**, 6536 (1977).
33. J. S. MARSHALL, S. WILLIAMS, Biochim. Biophys. Acta, **543**, 41 (1979).
34. R. J. STOCKERT, M. S. KRESSNER, J. C. COLLINS, I. STERNLIEB, A. G. MORELL. Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **79**, 6229 (1982).

35. I. STERNLIEB, R. J. STOCKERT, J.C. COLLINS, M. S. KRESSNER, C. S. FARBER, A.G. MORELL, in *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red. H. POPPER, MTP Press Limited, 1983, p. 445.
36. J. S. MARSHALL, S. WILLIAMS, P. JONES, G. W. HEPNER, J. Lab. Clin. Med., **92**, 30 (1978).
37. T. ARIMA, Y. MOTOYAMA, T. YAMAMOTO, K. NAGATA, T. KONDO, Gastroenterol. Jap., **12**, 39 (1977).
38. G. SOBUE, A. KOSAKA, Hepato-Gastroenterology, **27**, 200 (1980).
39. M. C. BORDAS, D. R. BION, J. M. FEGER, G. M. DURAND, D. H. JOZIASSE, D. H. VAN DEN EINJNDEN, Clin. Chim. Acta, **116**, 17 (1981).
40. M. E. TAYLOR, J. A. SUMMERFIELD, FEBS Letters, **173**, 63 (1984).
41. Y. KOZUTSUMI, T. KAWASAKI, I. YAMASHINA, Biochem. Biophys. Res. Commun. **95**, 638 (1980).
42. V. KOLB-BACHOFEN, J. SCHLEPPER-SCHAFER, R. TERADEIRA, D. VOGT, H. JOLB, in *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red. H.POPPER, MTP Press Limited, 1983, p. 284.
43. E. A. FRIEDRICH, V. BURKART, H. KOLB, Poster 23, in *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red. H. POPPER, MTP Press Limited, 1983, p. 622.
44. H. HILL, J. SCHLEPPER-SCHAFER, V. KOLB-BACHOFEN, E. FRIEDRICH, H. KOLB, Poster 24, in *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red. H. POPPER, MTP Press Limited, 1983, p. 623.
45. E. MULLER, G. SCHRODER, M. W. FRANCO, A. K. SHUKLA, R. SCHANER, *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 3, sub red. T. C. BØG-HANSEN, G. A. SPENGLER, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1983, p. 435.
46. L. G. GÜRTLER, Immunobiology, **158**, 426 (1981).
47. C. KIEDA, M. MONSIGNY, M. J. WAXDAL, in *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 3, sub red. T. C. BØG-HANSEN, G. A. SPENGLER, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1983, p. 427.
48. U. H. KOSZNOWSKI, M. KRAMER, Nature, **289**, 181 (1981).
49. R. P. McDERMATT, L. J. KIENKOR, M. J. BERTOVICH, A. V. MUCHMORE, Immunology, **44**, 143 (1981).
50. E. W. ADES, A. HINSON, J. M. DEKER, Immunobiology, **160**, 248 (1981).
51. T. K. GARTNER, D. C. WILLIAMS, D. R. PHILLIPS, Biochem. Biophys. Res. Commun., **79**, 592 (1977).
52. T. K. GARTNER, D. C. WILLIAMS, F. C. MINION, D. R. PHILLIPS, Science, **200**, 1281 (1978).
53. T. K. GARTNER, D. R. PHILLIPS, D. C. WILLIAMS, FEBS Letters, **113**, 196 (1980).
54. T. K. GARTNER, J. M. GERRARD, J. G. WHITE, D. C. WILLIAMS, Nature, **289**, 688 (1981).
55. K. M. YAMADA, K. OLDEN, Nature, **275**, 179 (1978).
56. P. J. SHADLE, S. H. BARONDES, J. Cell. Biol., **95**, 361 (1982).
57. K. J. CLEMETSON, J. L. McGREGOR, E. F. LUSCHER, in *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 3, sub red. T. C. BØG-HANSEN, G. A. SPENGLER, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1983, p. 303.
58. P. CLEZARDIN, J. L. McGREGOR, E. JAMES, K. J. CLEMETSON, M. DECHAVANE, in *Marker Proteins in Inflammation*, vol. 2, sub red. P. ARNAUD, J. BIENVENU, P. LAURENT, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1984, p. 601.
59. W. J. BOOTH, F. H. FURBY, M. C. BERNDT, P. A. CASTALDY, Biochim. Biophys. Res. Commun., **118**, 495 (1984).
60. M. C. BERNDT, P. A. CASTALDI, S. GORDON, A. HALLEY, Y. L. McPHERSON, Austr. N. Z. J. Med., **13**, 387 (1983).
61. J. KOUTTS, P. N. WALSH, B. F. PLOW, J. W. FONTAN, B. N. BOUMA, T. S. ZIMMERMAN, J. Clin. Invest., **62**, 1255 (1978).
62. T. B. TSCHOOP, H. J. WEISS, A. R. BAUMGARTNER, J. Lab. Clin. Med., **83**, 296 (1974).
63. F. FAUVEL, M. E. GRANT, Y. J. LEGRAND, H. SOUCHON, C. TOBELEM, D. C. JACKSON, J. P. CAEN, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **80**, 551 (1983).
64. D. J. BOWLES, D. E. HANKE, FEBS Letters, **82**, 34 (1977).
65. S. DE PETRIS, Exp. Cell. Res., **152**, 510 (1984).
66. J. T. WHICHER, in *Marker Proteins in Inflammation*, vol. 2, sub red. P. ARNAUD, J. BIENVENU, P. LAURENT, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1984, p. 89.
67. I. KRAUSHNER, in *Marker Proteins in Inflammation*, vol. 2, sub red. P. ARNAUD, J. BIENVENU, P. LAURENT, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1984, p. 3.
68. I. KUSHNER, J. E. VOLANAKIS, H. GEWARZ, Ann. N. Y. Acad. Sci., 389 (1982).
69. M. B. PEPYS, M. L. BALTZ, Adv. Immunol., **34**, 141 (1983).

70. C. MOLD, S. NAKAYAMA, T. J. HOLZER, H. GEWURZ, T. W. DU CLOS, J. Exp. Med., **154**, 1703 (1981).
71. A. J. YOTHER, J. E. VOLANAKIS, D. E. BRILES, J. Immunol., **128**, 2374 (1982).
72. C. R. K. HIND, P. M. COLLINS, D. RENN, R. B. COOK, D. CASPI, M. L. BALTZ, M. B. PEPYS, J. Exp. Med., **159**, 1058 (1984).
73. L. KENNE, B. LINDBERG, în *The Polyssaccharides*, vol. 2, sub red., G. O. ASPINALL, Academic Press, New York, 1983, p. 287.
74. C. R. K. HIND, P. M. COLLINS, M. L. BALTZ, M. B. PEPYS, Biochem. J., **225**, 107 (1985)
75. M. CARON, A. FAURE, Rev. Franç., Transf. Immuno-hématol., **XXV** (5), 527 (1982).
76. T. K. GARTNER, P. P. AGIN, Biochem. Biophys., Res. Commun., **96**, 1747 (1980).
77. K. OLDEN, R. PRATT, K. M. YAMADA, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **76**, 3343 (1979).
78. D. A. MORRIS, R. A. F. CLARK, L. M. SWIGART, J. C. HUFF, W. L. WESTON, S. E. HOWELL, J. Immunol., **129**, 1612 (1982).
79. S. C. STAMATOGLOU, J. M. KELLER, Biochim. Biophys. Acta, **719**, 90 (1982).
80. M. CARON, în *Marker Proteins in Inflammation*, vol. 2, sub red. P. ARNAUD, J. BIENVENU, P. LAURENT, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1984, p. 627.
81. F. A. BLUMENSTOCK, T. M. SABA, P. WEBER, R. LAFFIN, J. Biol. Chem., **253**, 4287 (1978).
82. A. VAHERI, Schweiz. Med. Wschr., **110**, 1457 (1980).
83. I. BARAKAT, M. SENSENBRENNER, G. LABOURDETTE, J. Neurose Res., **8**, 303 (1982).
84. M. CARON, R. JOUBERT, M. A. DEUGNIER, F. RIOUX, M. SENSENBRENNER, J. C. BISCONTE, Lectines 1983, Abstract L—13 1983.
85. J. P. ZANETTA, A. REEBER, M. DONTENWILL, G. VINEENDON, J. Neurochem., **42**, 334 (1984).
86. V. I. TELCHBERG, I. SILMAN, D. D. BEITSCH, G. RESHEFF, Proc. Nat. Acad., Sci., Wash., **72**, 1383 (1975).
87. S. H. BARONDES, Ann. Rev. Biochem., **50**, 207 (1981).
88. H. DEN, D. A. MALINZAC, J. Biol. Chem., **252**, 5444 (1977).
89. T. P. NOWAK, D. KOBILER, L. E. ROEL, S. H. BARONDES, J. Biol. Chem., **252**, 6026 (1976).
90. T. R. PODLESKI, I. GREENBERG, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **77**, 1054 (1980).
91. T. K. GARTNER, T. R. PODLESKI, Biochem. Biophys. Res. Commun., **67**, 972 (1975).
92. H. DEN, D. A. MALINZAK, A. ROSENBERG, Biochem. Biophys. Res. Commun., **69**, 621 (1976).
93. E. C. BEYER, K. TOKUYASU, S. H. BARONDES, J. Cell. Biol., **82**, 565 (1979).
94. E. COHEN, în *Recognition Proteins, Receptors and Probes : Invertebrates*, sub red. E. COHEN, Alan R. Liss, Inc., New York, 1984, p. XI.
95. E. COHEN, G. R. VASTA, în *Developmental Immunology: Clinical Problems and Aging*, sub red. M. COOPER, M. A. B. BRAZIER, Academic Press, New York, 1982, p. 99.
96. R. S. ANDERSON, R. A. GOOD, J. Invert. Path., **27**, 57 (1976).
97. L. RENWRANTZ, W. MOHR, J. Invert. Path., **31**, 164 (1979).
98. L. RENWRANTZ, în *Aspects of Developmental and Comparative Immunology*, vol. I, sub red. J. B. SOLOMON, Pergamon Press, New York, 1981, p. 133.
99. L. RENWRANTZ, A. STAHMER, J. Comp. Physiol., **149**, 535 (1983).
100. T. C. CHENC, J. J. MARCHALONIS, G. R. VASTA, în *Recognition Proteins, Receptors and Probes: Invertebrates*, sub red. E. COHEN, Alan R. Liss, Inc., New York, 1984, p. 1.
101. C. J. BAYNE, M. N. MOORE, T. H. CAREFOOT, R. J. THOMPSON, J. Invest Path., **34**, 1 (1979).
102. G. R. VASTA, E. COHEN, Develop. Comp. Immunol., **6**, 219 (1982).
103. G. R. VASTA, E. COHEN, Experientia, **39**, 721 (1983)
104. G. R. VASTA, J. J. MARCHALONIS, Amer. Zool., **23**, 157 (1983).
105. G. R. VASTA, J. J. MARCHALONIS, în *Recognition Proteins, Receptors and Probes : Invertebrates*, sub red. E. COHEN, Alan R. Liss, Inc., New York., 1984, p. 177.
106. G. R. VASTA, G. W. WARR, J. J. MARCHALONIS, Develop. Comp. Immunol., **7**, 13 (1983).
107. G. R. VASTA, F. CASSELS, Amer. Zool., **23**, 901 (1983).
108. M. H. RAVINDRANATH, E. L. COOPER, în *Recognition Proteins, Receptors and Probes: Invertebrates*, sub red. E. COHEN, Alan R. Liss, Inc., New York, 1984, p. 83.
109. G. A. AMIRANTE, F. G. MAZZALAI, Develop. Comp. Immunol., **2**, 735 (1978).
110. G. R. VASTA, J. T. SULLIVAN, T. C. CHENC, J. J. MARCHALONIS, G. W. WARR, J. Invert. Path., **40**, 367 (1982).
111. R. K. WRIGHT, E. L. COOPER, în *Recognition Proteins, Receptors and Probes : Invertebrates*, sub red. E. COHEN, Alan R. Liss, Inc., New York, 1984, p. 115.

REZONANȚA ELECTRONICĂ DE SPIN (RES) ÎN STUDIUL MEMBRANELOR

DAN MIHĂILESCU, ROMEO POPA

Introducere

I. PRINCIPIUL METODEI ȘI APARATURA UTILIZATĂ ÎN RES
1. Principiile fizice ale spectroscopiei RES
2. Componentele spectrometrelor RES și condițiile experimentale
3. Markeri de spin
II. APLICAȚII LA STUDII DE MEMBRANĂ
1. Orientarea și mișcările lipidelor membranare
2. Interacțiunea lipid-proteină
3. Sisteme de transport membranare
4. Parametri celulari măsurabili prin RES

INTRODUCERE

Membranele celulare sînt intens studiate în prezent de biochimiști și biofizicieni datorită rolului lor în fenomenele celulare (1), (2). Funcția unei membrane depinde nu numai de structura sa, ci și de dinamica componenților membranari (3), (4).

O tehnică aplicată relativ recent în biologie, care permite studiul acestui al doilea aspect al membranei, este RES. Numită și rezonanță electronică paramagnetică (REP), deoarece nu pot fi investigate prin ea decît substanțe paramagnetice, RES este o spectroscopie de absorbție electronică a radiației electromagnetice. Pentru a putea fi investigați prin această tehnică, componenții membranari, care în mod obișnuit nu au paramagnetism electronic intrinsec, sînt „marcați", de ei fiind atașată o grupare paramagnetică. În majoritatea cazurilor, markerul este gruparea nitroxid. RES poate fi folosită atît în cazul membranelor reconstituite, cît și al membranelor biologice. Mișcările moleculare ce pot fi sesizate prin această tehnică se caracterizează prin timpi de ordinul 0,1 microsecunde sau mai scurți (5).

I. PRINCIPIUL METODEI ȘI APARATURA UTILIZATĂ ÎN RES

Teoria rezonanței electronice de spin este teoria cuantică. Aparatura RES este relativ simplu de manipulat. Vom face în continuare, pe scurt, cîteva considerații teoretice și practice legate de această metodă.

1. PRINCIPIILE FIZICE ALE SPECTROSCOPIEI RES

RES se bazează pe interacțiunea radiației electromagnetice cu substanța. Un electron dintr-un atom sau dintr-o moleculă va „sări" de pe un nivel energetic pe altul la interacțiunea sa cu fotonii, dacă sînt satisfăcute: a) condiția de rezonanță $\Delta E = h\nu$, unde ΔE este diferența de energie dintre

St. cerc. biochim., 28, 2, 172–185 (1985)

cele două nivele, ν frecvența fotonilor, h constanta lui Planck; b) regulile cuantice de selecție.

RES se bazează și pe efectul Zeeman. Acesta constă în multiplicarea nivelelor energetice ale unui sistem cuantic plasat în cîmp magnetic (nivelele energetice se „despică"). Plasînd proba în cîmp magnetic, o

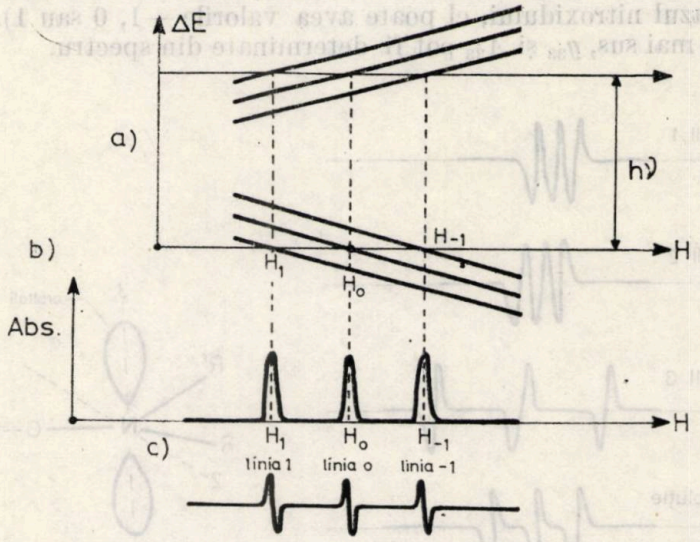


Fig. 1. — a, Creșterea lui ΔE cu variația lui H și producerea rezonanței (la valorile H_1, H_0 și H_{-1}); b, spectrul corespunzător de absorbție a radiației electromagnetice (microunde); c, spectrul RES corespunzător (prima derivată a spectrului de absorbție).

parte din electronii moleculelor marcate vor „sări" pe nivele superioare (apărute după despicare) în urma interacțiunii lor cu radiația electromagnetică incidentă. Fotonii care au interacționat cu electronii, provocîndu-le salturi, dipar; această pierdere de radiație electromagnetică va fi sesizată de un detector.

Diferența de energie dintre două nivele care au rezultat ca urmare a despicării unui nivel la plasarea probei în cîmp magnetic este proporțională cu intensitatea cîmpului magnetic H. În practică, la un tip de spectrometre RES, H este crescut liniar cu timpul (altfel spus este baleiat), rezonanța producîndu-se în momentul cînd $\Delta E \sim H$ satisface condiția a. Frecvența radiației incidente pe probă este menținută în acest caz constantă (fig. 1). ΔE dintre două nivele nu depinde numai de intensitatea cîmpului magnetic în care este plasat sistemul cuantic, ci și de orientarea și mișcarea acestuia față de cîmpul magnetic, spectrul RES modificîndu-se și el corespunzător (fig. 2).

Dependența lui ΔE de caracteristicile atomo-moleculare ale sistemului este dată de teoria cuantică. Cei doi tensori, g și A (tensorul hiperfin), de care depinde, conform teoriei, ΔE, sînt diagonali în sistemul de axe propriu al moleculei (fig. 3):

$$g = \begin{bmatrix} g_{11} & 0 & 0 \\ 0 & g_{22} & 0 \\ 0 & 0 & g_{33} \end{bmatrix} \qquad A = \begin{bmatrix} A_{11} & 0 & 0 \\ 0 & A_{22} & 0 \\ 0 & 0 & A_{33} \end{bmatrix}.$$

Cînd $H \parallel 3$, de exemplu (fig. 2), condiția de rezonanță se scrie (6):

$$g_{33} \cdot \beta \cdot H_{m_I} + A_{33} \cdot m_I = h\nu \qquad (*)$$

unde β este magnetonul Bohr, iar m_I numărul cuantic nuclear de spin (în cazul nitroxidului, el poate avea valorile -1, 0 sau 1). Conform relației de mai sus, g_{33} și A_{33} pot fi determinate din spectru.

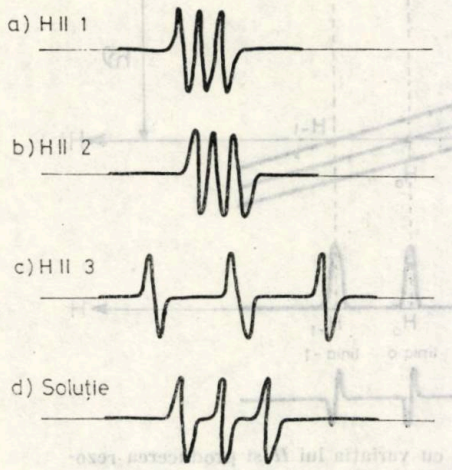


Fig. 2. — a, b și c, Spectre RES pentru diverse orientări ale unei probe monocristaline. Din pozițiile liniilor (vezi *) pot fi aflați g_{33} și A_{33} (după) (6)).

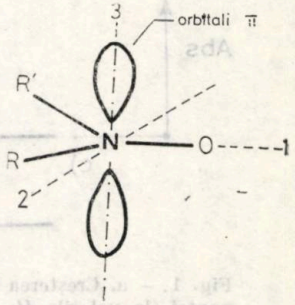


Fig. 3. — Axele proprii ale nitroxidului (după (10)).

Pentru nitroxidul legat de diverse molecule, există în literatura de specialitate (7) tabele ce dau valorile principale ale tensorilor g și A pentru proba în stare cristalină. Trimitem pentru detalii privind principiile fizice ale RES la (8) și (9).

2. COMPONENTELE SPECTROMETRELOR RES ȘI CONDIȚIILE EXPERIMENTALE

Instrumentele folosite în mod obișnuit în studiul membranelor lucrează în „banda X" de frecvențe (9 GHz) și necesită un cîmp de 3 300 Gs pentru înregistrarea spectrului RES al grupării nitroxid. În figura 4 se dă diagrama bloc a unui spectrometru standard:

1. Klistronul este sursa de microunde. Legătura cu celelalte componente de bază ale sistemului, cavitatea și detectorul, se face prin ghidul de undă.

2. Atenuatorul operează ca o sursă de putere variabilă, reducînd din puterea maximă a klistronului (50—60 mW).

3. Circulatorul (la instrumentele mai vechi, „T magic") face legătura între cele trei ramuri ale ghidului, permițînd măsurarea absorbției la rezonanță printr-o punte de microunde (asemănător cu puntea Wheastone). Dacă este făcut acordul cavității, ramurile *a* și *b* sînt echilibrate și

pe detector cade puțină radiație. La rezonanță, proba absoarbe, puntea se dezechilibrează, fapt înregistrat de detector.

4. Cavitatea, locul în care se plasează proba, poate fi rectangulară sau cilindrică, cea din urmă cu o sensibilitate sporită.

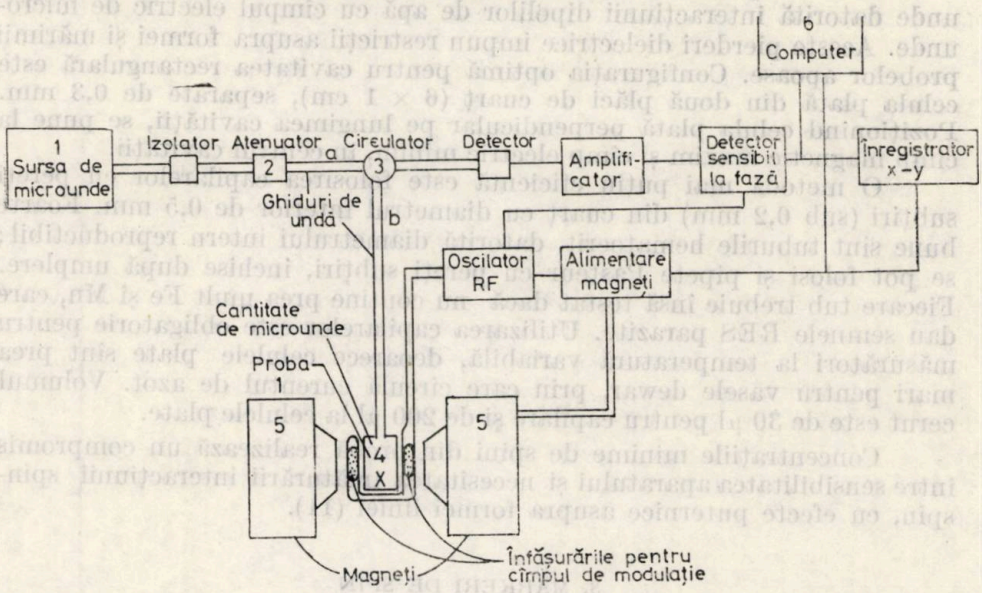


Fig. 4. — Diagrama bloc a unui spectrometru RES (după (10)).

5. Magnetul aplică un cîmp magnetic uniform, perpendicular pe cel de microunde. După realizarea manuală a acordului cavității (prin modificarea lungimii), frecvența este menținută constantă în mod automat și cîmpul magnetic se baleiază. Pentru ușurința amplificării, cîmpul magnetic este modulat cu 100 kHz. În final, un detector sensibil la fază dă curentul continuu pentru înregistratorul XY. Metoda de detecție duce la obținerea primei derivate a spectrului de absorbție; pe abscisă se găsește intensitatea cîmpului magnetic.

6. Minicomputere de laborator cu care sînt echipate spectrometrele moderne sînt indispensabile pentru medieri, integrări, extrageri și simulări de spectre.

Abscisa înregistratorului este în prealabil etalonată în gauși cu un magnetometru RMN sau cu ajutrul unei probe ce conține multe linii înguste, de poziții cunoscute. Se măsoară direct din spectru, în gauși, despicările hiperfine și lățimile liniilor la semiînălțime (vezi și fig. 6). Deoarece, în cazul primei derivate, înălțimea liniei crește cu pătratul lățimii, o alternativă a măsurărilor de lățime este determinarea înălțimii în unități relative (se interpretează doar rapoarte de înălțimi).

Concentrația de spini fiind proporțională cu aria de sub spectrul de absorbție, pentru astfel de determinări trebuie făcută o dublă integrare a semnalului. Concentrațiile absolute se determină cel mai bine prin comparare cu probe standard, de concentrație cunoscută. Se știe că sensibilitatea cavității este în funcție de temperatură și calibrarea concentrației de spini trebuie făcută la fiecare temperatură. O creștere a intensității din spectrul RES nu reprezintă în mod necesar o creștere de concentrație (10).

Este deosebit de important să ne asigurăm că spectrele nu sînt perturbate de condițiile de înregistrare (putere, acord, cîmp de modulație, constantă de timp).

Probele apoase sînt extrem de absorbante la frecvențe de microunde datorită interacțiunii dipolilor de apă cu cîmpul electric de microunde. Aceste pierderi dielectrice impun restricții asupra formei și mărimii probelor apoase. Configurația optimă pentru cavitatea rectangulară este celula plată din două plăci de cuarț (6 × 1 cm), separate de 0,3 mm. Poziționînd celula plată perpendicular pe lungimea cavității, se pune la cîmp magnetic maxim și cîmp electric minim, în centrul cavității.

O metodă mai puțin eficientă este folosirea capilarelor cu pereți subțiri (sub 0,2 mm) din cuarț cu diametrul interior de 0,5 mm. Foarte bune sînt tuburile hematocrit, datorită diametrului intern reproductibil; se pot folosi și pipete Pasteur cu pereți subțiri, închise după umplere. Fiecare tub trebuie însă testat dacă nu conține prea mult Fe și Mn, care dau semnele RES parazite. Utilizarea capilarelor este obligatorie pentru măsurători la temperatură variabilă, deoarece celulele plate sînt prea mari pentru vasele dewar, prin care circulă curentul de azot. Volumul cerut este de 30 μl pentru capilare și de 200 μl la celulele plate.

Concentrațiile minime de spini din probă realizează un compromis între sensibilitatea aparatului și necesitatea înlăturării interacțiunii spin-spin, cu efecte puternice asupra formei liniei (11).

3. MARKERI DE SPIN

În studiile membranelor sînt folosite două clase de markeri: cei derivați din inel oxazolidinic și cei derivați din inel pirolidinic sau piperidinic (7), (12). Subclasele de markeri sînt indicate cu cifre romane (fig. 5). Markerii din prima clasă sînt în special folosiți în analiza mișcării moleculare din sistemele membranare. O importantă aplicație a markerilor proveniți dintr-un inel pirolidinic sau piperidinic este folosirea lor în sinteză unor markeri pentru proteine.

Se recomandă ca, înaintea folosirii, markerii să fie purificați prin cromatografie, chiar dacă au fost produși de companii chimice specializate (13).

Cum se marchează? Markerii solubili în apă, care se împart între soluția apoasă și membrană, și markerii pentru proteinele membranare se adaugă simplu în soluție sau se dispersează membranele în soluție de marker. Pentru marcarea bistraturilor lipidice sau a complexelor lipid-proteină, markerul se amestecă 1 mol% cu lipidele, înainte de prepararea acestor modele de membrană.

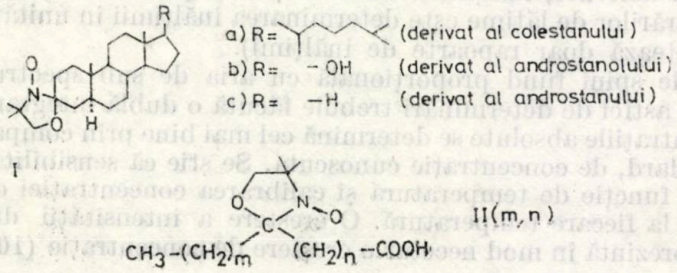


Fig. 5. — Probe marcate din subclasele I (steroizi) și II (derivați ai acizilor grași) (după (6)).

Puţin mai dificilă este marcarea membranelor biologice cu markeri lipidici. La suspensia de membrane se adaugă o cantitate mică de soluţie concentrată de marker în etanol. Markerul nelegat şi etanolul pot fi înlăturaţi prin centrifugare şi resuspendarea membranelor în soluţie apoasă proaspătă. Prezenţa etanolului se poate evita dacă se acoperă pereţii interiori ai vasului cu marker prin evaporare din soluţie de cloroform. Un contact mai intim se obţine cu serumalbumină bovină marcată; după incubare este îndepărtată prin centrifugare.

Agenţii reducători ascorbat, ditioniţi, fenilhidrazină, cisteină, mercaptoetanol, glutation redus sînt capabili să ducă la scăderea paramagnetismului markerilor. Ei sînt folosiţi pentru a proiecta experimente care dovedesc accesibilitatea grupărilor marcate sau înlăturarea selectivă a spinilor expuşi la faza apoasă (vezi 2 şi 3 din capitolul referitor la aplicaţii).

II. APLICAŢII LA STUDII DE MEMBRANĂ

În cazul, des întîlnit experimental, al unei dispersii dezordonate de bistraturi, spectrele RES sînt mai complicate (fig. 6) decît pentru proba cristalină (fig. 2).

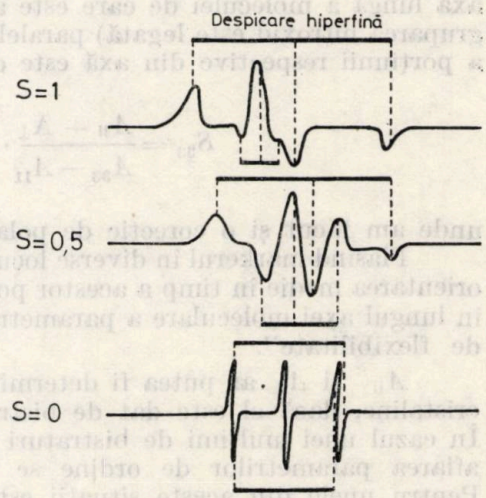


Fig. 6. — Spectre simulate date de o dispersie de bistraturi diferit orientate, avînd trei valori diferite ale parametrului de ordine (după (14))

Pentru situaţia mai simplă a unor bistraturi cu aceeaşi orientare şi mişcări ale moleculei de nitroxid (relative la bistrat) în care aceasta îşi schimbă rapid orientarea (timpi de corelaţie mai mici decît 3 nanosecunde), teoria este formal echivalentă cu cea din cazul stării cristaline (cînd molecula era „îngheţată"), în locul tensorilor g şi A considerîndu-se tensorii (în sistemul de coordonate al bistratului lipidic) (fig. 7):

$$g = \begin{bmatrix} g_{\parallel} & 0 & 0 \\ 0 & g_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & g_{\perp} \end{bmatrix} \qquad \tilde{A} = \begin{bmatrix} A & 0 & 0 \\ 0 & A_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & A_{\perp} \end{bmatrix}$$

unde, de exemplu (14):
$A_{\parallel} = (A_{33} - A_{11}) \langle \cos^2 \theta_3 \rangle + A_{11}$
$\langle \cos^2 \theta_i \rangle$ fiind media în timp a pătratului cosinusului unghiului pe care îl face axa i cu axa $\parallel$.

Orientarea medie în timp a markerului este convenabil (din punct de vedere experimental) caracterizată de parametrul (numit de ordine)

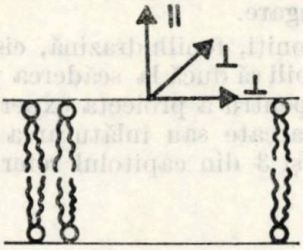


Fig. 7. — Sistemul de axe ale bistratului.

$$S_{ii} = \frac{1}{2} (3 \langle \cos^2 \theta_i \rangle - 1)$$

În numeroase cazuri (probele derivate din acizi graşi, de exemplu), axa lungă a moleculei de care este ataşat nitroxidul este (în locul unde gruparea nitroxid este legată) paralel cu axa 3. Orientarea medie în timp a porţiunii respective din axă este dată de

$$S_{33} = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{33} - A_{11}} \cdot \frac{A_{11} + A_{22} + A_{33}}{A_{\parallel} + 2A_{\perp}}$$

unde am făcut şi o corecţie de polaritate (15).

Plasînd markerul în diverse locuri pe lanţul hidrocarbonat, deducem orientarea medie în timp a acestor porţiuni, adică flexia lanţului. Variaţia în lungul axei moleculare a parametrului de ordine se numeşte „gradient de flexibilitate".

$A_{\parallel}$ şi $A_{\perp}$ ar putea fi determinate din spectru, ca în cazul probei cristaline, dacă el este dat de bistraturi avînd toate aceeaşi orientare. În cazul unei mulţimi de bistraturi de orientări diferite (fig. 6), pentru aflarea parametrilor de ordine se practică simularea spectrului (16). Pentru unele din aceste situaţii este încă posibilă determinarea direct din spectru a mărimilor $A_{\parallel}$ şi $A_{\perp}$ (16), (17).

Parametrii mişcării moleculare, care descriu rapiditatea reorientării moleculei (timpii de corelaţie), pot fi şi ei determinaţi folosind RES. Astfel, pentru mişcări izotrope şi rapide ale moleculelor (timpi de corelaţie între 3 ns şi 0,01 ns (7), timpul de corelaţie este dat de (6):

$$\tau(\Delta) = 6{,}5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}} - 1} \right)$$

unde ΔH_0 este lărgimea liniei centrale (în gauşi);
h_0 şi h_{-1} sînt, respectiv, înălţimile liniilor spectrale 0 şi -1.

Pentru mișcări anizotrope la fel de rapide se recurge la simulări. Analiza mișcării este diferită în cazul cînd ea este mai lentă (18), recurgîndu-se și în acest caz la simulări (19).

Toate cele menționate au fost considerații care au făcut abstracție de interacțiunea spin-spin (interacțiune între markeri datorită paramagnetismului lor, care nu există într-o membrană naturală). Aceasta complică analiza spectrelor. Pentru a o reduce cît mai mult (în afară de cazurile cînd acest efect este urmărit în mod special) se recomandă micșorarea concentrației de marker (13).

Vom ilustra în continuare, prin exemple, informațiile ce se pot obține din studiul membranelor biologice prin tehnica RES.

1. ORIENTAREA ȘI MIȘCĂRILE LIPIDELOR MEMBRANARE

Acizi grași, marcați aproape de regiunea polară, cu axa z a grupării nitroxid paralelă cu lanțul hidrocarbonat, au fost încorporați în membrana eritrocitară orientată (20). Despicarea hiperfină maximă obținîndu-se la cîmp magnetic extern perpendicular pe suprafața celulei (vezi și fig. 2), s-a tras concluzia următoare : orientarea preferențială a lipidelor membranare în zona polară este cu lanțul hidrocarbonic perpendicular pe suprafață.

În bistraturi fosfolipidice orientate, diferența dintre spectrele înregistrate la cîmp normal, respectiv paralel cu suprafața bistratului scade dacă gruparea marker se deplasează de la capătul polar spre „coada" lipidului (21). Cu spinul în ultima poziție, spectrul indică aproape o mișcare izotropă (fig. 8). Aceasta arată că lanțurile lipidice sînt ordonate la suprafață și „fluide" în interior și că există un gradient de flexibilitate pozitiv spre interior.

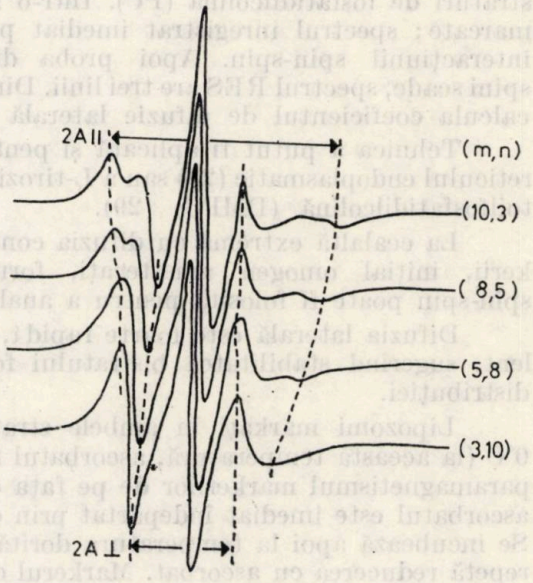


Fig. 8. — Spectrul RES al probelor marcate III (m, n) în bistraturi de fosfatidilcolină (după (7)).

La temperaturi la care lanțurile devin „înghețate" pe toată lungimea (în scara de timp RES), are loc tranziția de fază (22).

Compararea cu date RMN a arătat că trebuie ţinut seama de efectul perturbator al grupării nitroxid (23).

O probă foarte simplă a fluidităţii membranei este dată de porţionarea unei molecule mici marcate (TEMPO) între faza apoasă şi cea lipidică (34). Cu cît fluiditatea este mai mare, cu atît va fi mai mare fracţia de TEMPO „dizolvată" în membrană. Spectrele în fază lipidică şi în apă se

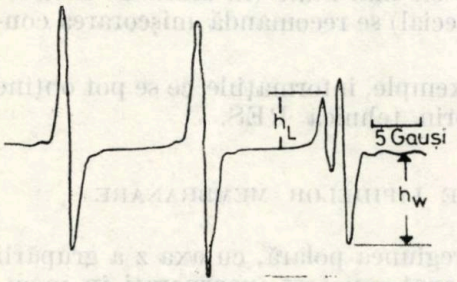


Fig. 9. — Spectrul RES al markerului TEMPO VIII în dispersia apoasă de fosfatidilcolină. h_L şi h_W sînt înălţimile picurilor în fază lipidică, respectiv în apă (după (24)).

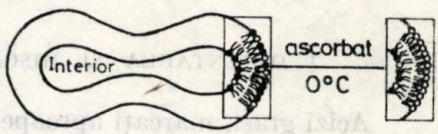


Fig. 10. — Reprezentarea schematică a metodei cu ascorbat de Na; cercurile pline şi cele goale reprezintă capetele polare ale fosfatidilcolinei marcate, respectiv nemarcate (după (24)).

rezolvă uşor în linia la cîmp mare (fig. 9). Gradul de partiţie se poate măsura din raportul înălţimilor liniilor: $\alpha = h_L/h_W$ sau $f = h_L/(h_L + h_W)$. Prin această metodă s-a studiat, de exemplu: 1) dependenţa fluidităţii de concentraţia de colesterol (7), (25); 2) detectarea tranziţiei de fază şi a separării laterale de fază, prin înregistrarea continuă a lui h_W funcţie de temperatură; 3) influenţa pH-ului, prin încărcarea capetelor polare ale fosfolipidelor, asupra tranziţiei de fază (26).

S-a măsurat coeficientul de difuzie laterală a fosfolipidelor în multistraturi de fosfatidilcolină (PC). Într-o zonă mică se adaugă fosfolipide marcate; spectrul înregistrat imediat prezintă o singură linie datorită interacţiunii spin-spin. Apoi proba difuzează, concentraţia locală de spini scade, spectrul RES are trei linii. Din analiza ratei schimbării se poate calcula coeficientul de difuzie laterală (27).

Tehnica a putut fi aplicată şi pentru difuzia laterală a lipidelor în reticulul endoplasmatic (28) sau a L-tirozinei marcate în matrice de dimiristoilfosfatidilcolină (DMPC) (29).

La cealaltă extremă cu difuzia controlată este situaţia în care markerii, iniţial omogen amestecaţi, formează „clusteri". Interacţiunea spin-spin poate fi folosită pentru a analiza acest proces (30).

Difuzia laterală este foarte rapidă, dar „flip-flopul" este extrem de lent, sugerînd stabilitatea bistratului fosfolipidic, persistenţa asimetriei distribuţiei.

Lipozomi markaţi în ambele straturi sînt trataţi cu ascorbat la 0°C (la această temperatură, ascorbatul nu pătrunde în interior), stingînd paramagnetismul markerilor de pe faţa externă (fig. 10). După reducere, ascorbatul este imediat îndepărtat prin cromatografie pe coloană, la 0°C. Se incubează apoi la temperatura dorită, diverse perioade de timp, şi se repetă reducerea cu ascorbat. Markerul care a difuzat din stratul interior la exterior („flip-flop") va fi „stins". Spectrele RES înregistrate după fiecare reducere indică o scădere exponenţială în timp a semnalului (24).

Multe experimente manipulează din exterior fluiditatea membranei, determinînd mobilitatea spinului încorporat. Perburbările folosite cu succes sînt :

— adăugarea de anestezice (31), (32), (33), (34), (35) ce produc o fluidizare datorită slăbirii interacțiunii lipid-proteină. O variantă o constituie folosirea anestezicelor marcate și elucidarea mecanismului de interacțiune cu membrana, acționînd cu agenți chimici, pH, temperatură (36);

— agenți reticulanți (37), (38), molecule mici (39), presiune osmotică (40);

— colesterol (41), (42);

— încorporare de lipide exogene prin substituție sau fuziune (43);

— modificări de dietă, care pot lua forma de adăugiri de acizi grași sau inhibitori ai biosintezei lipidelor atît în mediul de cultură celulară (11), (44), cît și în hrana animalelor (45), (46).

2. INTERACȚIUNEA LIPID-PROTEINĂ

Deși mai există controverse (47), pot fi trase unele concluzii generale prin RES, care par a nu fi influențate de caracterul perturbator al tehnicii (48), (49) (comportarea unui component membranar marcat nefiind totuși complet identică cu a unuia nemarcat). Se presupune că interacțiunea lipid-proteină se modifică odata cu îmbătrînirea celulară (50).

În unele cazuri s-a găsit că aceasta este mediată ionic (51). Modificarea compoziției în proteine a membranei schimbă comportamentul lipidelor (mobilitatea lor) (52), iar modificarea compoziției lipidelor afectează comportamentul proteinelor (53). Funcționalitatea acestora din urmă este afectată și de mobilitatea lipidelor. Astfel, Ca^{2+} ATP-aza reticulului sarcoplasmic este aproape inactivă cînd lipidele sînt în faza de gel (54), (55); tranziția meta I — meta II a rodopsinei în cadrul ciclului vizual este blocată cînd ea se găsește în faza de gel (56); β-hidroxibutirat-dehidrogenaza are nevoie în activitatea ei de molecula de fosfatidilcolină (57) și se presupune că citocromoxidaza are nevoie de cardiolipină (58).

S-a stabilit, descompunîndu-se spectrul RES în două componente, una dată de lipidele foarte mobile, cealaltă de cele mai puțin mobile, că numărul lipidelor din membrană care interacționează cu proteinele intramembranare (integrale) manifestă o stoichiometrie fixă față de numărul de proteine (59), (60), stoichiometrie ce se corelează aproximativ cu numărul lipidelor care ar putea forma o „cămașă" monostrat în jurul proteinei. Lipidele care interacționează cu proteinele sînt de 3—50 de ori mai lente decît cele din bistratul fluid (61). Timpul de viață în vecinătatea proteinei al unei molecule lipidice a fost estimat la 100—200 ns (48). Există o selectivitate parțială a proteinelor pentru diverse grupări polare fosfolipidice, selectivitate ce diferă cu proteina (60). Raza de acțiune a proteinelor asupra lipidelor este scurtă, neîntinzîndu-se mult dincolo de primul strat de lipide ce înconjură proteina (48).

3. SISTEME DE TRANSPORT MEMBRANARE

Metoda de reducere cu ascorbat se poate aplica la măsurarea vitezei de transfer a moleculelor hidrosolubile de marker prin canale membranare. Din stocul de soluție se ia din timp în timp aceeași cantitate și se tratează cu ascorbat la 0°C. Spectrele RES fiind de aceeași formă, concentrația de

marker difuzată este proporțională cu înălțimea liniei; ca măsură a difuziei se ia raportul relativ al înălțimilor liniilor (62). Alternativ, dacă se încarcă veziculele cu marker la preparare, iar spinii exteriori sînt îndepărtați prin cromatografie sau dializă la temperaturi joase, se studiază difuzia de la interior la exterior. Efectul iradierii gamma asupra permeabilității membranei la doi markeri, TEMPO și TEMPOL, arată că cele două molecule sînt transportate prin canale diferite.

Muphree și colab. (63) studiază modificarea permeabilității lipozomilor la ascorbat în urma tratării cu medicamente. Intrînd în interior, ascorbatul stinge paramagnetismul markerilor de pe fața internă.

În compoziție cu metoda cu radioizotopi pentru studiul cineticii legării (deci și al transportului mediat), RES, deși mai puțin sensibil, prezintă avantajul că nu este necesară îndepărtarea markerului nelegat. Se pot înregistra spectre simultane ale probei libere și ale celei legate. Este simplu astfel de urmărit cinetica legării măsurînd timpul de schimbare al spectrului. De exemplu, s-a studiat legarea morfinei de receptori specifici (64). Morfina a fost marcată, iar concentrația de marker legat a fost măsurată din linia RES, lărgită datorită imobilizării. Din influența unor factori fizici (pH, tărie ionică) asupra cineticii legării clorpromazinei marcate de calmodulin se încearcă elucidarea naturii interacțiunii lor (hidrofobă sau polară) (65), (66). Marsh și colab. (48) analizează receptorul acetilcolinei.

Funcțiile membranelor sînt datorate în special componenților proteici; lipidele pot afecta funcția membranei, schimbînd conformația proteinelor (23). Există dovezi că diverse enzime din membrană sînt sensibile la alterarea fluidității bistratului.

Pentru determinarea poziției locului activ al enzimei se folosește un marker inhibitor ce nu pătrunde în interior (67). Alți inhibitori specifici împiedică legarea markerului deoarece în spectru nu mai apare componenta specifică rigidă. Din studiul parametrilor de ordine, al timpilor de corelație în paralel cu activitatea ($Na^+ + K^+$) ATP-azelor se deduce că afinitatea locurilor active interne ale pompei de Na^+ și K^+ este controlată de colesterol prin alterarea ordinii lipidelor (68), (69). Markeri ai proteinelor (maleimidă, iodacetamidă) sînt folosiți pentru titrarea legăturilor SH din aceste enzime, pentru clasificarea lor după tipul mișcării și se încearcă detectarea grupărilor susceptibile de schimbări conformaționale la activarea enzimei (70), (71).

4. PARAMETRI CELULARI MĂSURABILI PRIN RES

Înregistrarea difuziei moleculelor de marker prin membrană în funcție de temperatură arată o creștere a liniei RES pînă la o valoare limită (fig. 11). Această valoare de saturație este o măsură directă a volu-

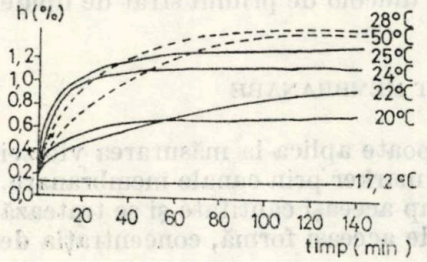


Fig. 11. — Înălțimea relativă a liniei RES, h(%) funcție de timp pentru difuzia TEMPOcolinei la diverse temperaturi (după (62)).

mului intern al veziculelor. Volumul per gram de lipid este dat simplu de $V = h_{max}/(h_0 \cdot c_{lipid})$, unde h_0 este înălțimea liniei pentru proba netratată, h_{max} este înălțimea limită a semnalului după o incubare lungă cu TEMPOcolină și c_{lipid} în g/ml este concentrația finală de lipid. Volumul intern se poate determina și prin reducerea la temperatura dorită a markerului exterior cu $Na_3Fe(CN)_6$, fiindcă această substanță nu poate pătrunde în interior (72). Pentru obținerea volumului intern al veziculelor fosfolipidice, se poate recurge la înglobarea markerului în lipozomi în timpul preparării, ulterior markerul exterior fiind îndepărtat sau „stins".

Reducerea este folosită și pentru măsurarea potențialului membranei pe baza distribuției de echilibru a markerilor încărcați electric. Se măsoară mai întîi volumul intern, ca mai sus, în situația în care nu există potențial transmembranar. Distribuția de echilibru este apoi determinată a fel în prezența potențialului. Distribuția interior-exterior este simplu legată de potențialul V:

$$S_i^{\pm}/S_{ex}^{\pm} = \exp(\mp eV/kT),$$

unde $S_i^{\pm}$ și $S_{ex}^{\pm}$ sînt concentrațiile de spini în interiorul și, respectiv, exteriorul veziculei, e este sarcina electronului, k constanta lui Boltzmann. În acest mod se măsoară un potențial de difuzie indus de Na^+ la membrane excitabile, folosind markerul cationic TEMPOcolină (53). Metoda nu se aplică dacă membrana este impermeabilă la markerul încărcat. Totuși, Kornberg și McConnell (după (6)) au găsit că se pot utiliza și markeri acizi slabi (TEMPOtartrat XXIV) permeabili neîncărcați. Ținînd seama de echilibrul acido-bazic al TEMPOtartratului, ionii de hidrogen rezultați astfel se vor distribui la echilibru în funcție de potențialul membranar. Metoda este foarte sensibilă la pH și, controlînd potențialul și volumul intern, se poate măsura pH-ul intern.

Autorii mulțumesc doctorului D. G. Mărgineanu pentru încurajarea și observațiile critice primite cu ocazia întocmirii acestui material și pentru bibliografia pusă la dispoziție, precum și întregului colectiv de biofizica membranelor din ISBB.

Prezentat la redacție
la 8 mai 1985

Institutul de științe biologice
București, Splaiul Independenței, nr. 296

BIBLIOGRAFIE

1. B. ALBERTS, D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, J. D. WATSON, *The Molecular Biology of the Cell*. Garland Publ., New York, 1983.
2. E. SCHNEPF, în *Biophysics*, sub red. W. HOPPE, W. LOHMANN, H. MARKL, H. ZIEGLER, Springer-Verlag, Berlin, 1983, p. 1.
3. S. J. SINGER, G. L. NICOLSON. Science, **175**, 720 (1972).
4. M. EDIDIN, în *Membrane Structure*, sub red. J. B. FINEAN, R. H. MICHELL, Elsevier, Nord—Holand Biomedical Press, Amsterdam, 1981, p. 37.
5. S. I. CHAN, D. F. BOCIAN, N. O. PETERSEN, în *Membrane Spectroscopy — Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, vol. 31, sub red. E. GRELL, Spriger-Verlag, Berlin, 1981, p. 1.
6. P. F. KNOWLES, D. MARSH, H. W. E. RATTLE, *Magnetic Resonance of Biomolecules*, Wiley, London, 1976.
7. D. MARSH, în *Membrane Spectroscopy—Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, vol. 31, sub red. E. GRELL, Springer-Verlag, Berlin, 1981, p. 51.

8. J. B. WERTZ, J. R. BOLTON, *ESR, Elementary Theory and Practical Applications*, Mc Graw-Hill, New York, 1972.
9. I. URSU, *Rezonanța electronică de spin*, Edit. Academiei, București, 1965.
10. W. LESLIE, M. FUNG, Ann. N. Y. Acad. Sci., **414**, 162 (1983).
11. R. POON, W. R. CLARK, Biochim. Biophys. Acta, **689**, 230 (1982).
12. B. J. GAFFNEY, în *Spin Labelling. Theory and Applications*, sub red. L. J. BERLINER, Academic Press, New York, 1976, p. 183.
13. C. C. CURTAIN, L.M. GORDON, în *Membranes, Detergents and Receptor Solubilization*, Alan R. Liss, Inc., New York, 1984, p. 177.
14. J. J. SEELIG, J. Amer. Chem. Soc., **92**, 3881 (1970).
15. W. L. HUBBLL, H. M. McCONNEL, J. Amer Chem. Soc., **93**, 314 (1971).
16. O. H. GRIFFITH, P. C. JOST, în *Spin Labelling Theory and Applications*, sub red. L. J. BERLINER, Academic Press, New York., 197 , p. 453.
17. L. J. LIBERTINI, C. A. BURKE, P. C. JOST, O. H. GRIFFRITH, J. Magn. Reson., **15**, 460 (1974).
18. S. SCHREIER, C. F. POLNAZEK, I. C. P. SMITH, Biochim. Biophys. Acta, **515**, 375 (1978).
19. J. H. FREED, în *Spin Labelling, Theory and Applications*, sub red. L. J. BERLINER, Academic Press, New York, 1976, p. 53.
20. W. L. HUBBEL, H. M. McCONNELL, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **64**, 20 (1969).
21. P. C. JOST, L. J. LIBERTINI, V. S. HERBERT, O. H. GRIFFITH, J. Mol. Biol., **59**, 77 (1971).
22. L. M. GORDON, R. D. SAUERHEBER, Biochim. Biophys. Acta, **466**, 34 (1977).
23. G. LENAZ, G. CURATOLA, J. Bioenerg., **7**, 223 (1975).
24. E. J. SHIMSHICK, H. M. McCONNELL, Biochemistry, **12**, 2351 (1973).
25. G. BENGA, A. HODĂRNĂU, M. IONESCU, V. I. POP, P. T. FRANGOPOL, V. STRUJAN, R. HOLMES, F. KUMMEROW, Ann. N. Y. Acad. Sci., **414**, 140 (1983).
26. A. WATTS, K. HARLOS, W. MASCHKE, D. MASH, Biochim. Biophys. Acta, **510**, 63 (1978).
27. P. DEVAUX, H. M. McCONNELL, J. Amer. Chem. Soc., **94**, 4475 (1972).
28. C. J. SCANDELLA, P. DEVAUX, H. M. McCONNELL, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **68**, 2056 (1972).
29. C. S. LAI, S. Y. CHENG, Biochim. Biophys. Acta, **692**, 27 (1982).
30. F. BEFRIX-QUERTAIN, P. MATELAIN, J. M. RUYSSCHAERT, M. DELMELL, Biochim. Biophys. Acta, **647**, 116 (1981).
31. G. LENAZ, L. MAZZANTI, G. CURRATOLA, E. BERTOLI, A. BIGI, G. ZOLESE, Ital. J. Biochem.. **27**, 401 (1978).
32. G. LENAZ, G. CURRATOLA, L. MAZZANTI, G. ZOLESE, E. BERTOLI, G. GRILLI, Gaz. Chim. Ital., **109**, 491 (1976).
33. G. CASTELLI, A. M. SECHI, L. LANDI, L. CABRINI, S. MASCARELLO, G. LENAZ, Biochim. Biophys. Acta, **547, 161** (1979).
34. S. A. MURPHREE, T. R. TRITTON, P. L. SMITH, A. C. SARTORELLI, Biochim. Biophys. Acta, **649**, 317 (1981).
35. T. OGISO, I. MASANIRO, M. KAZUKO, Biochim. Biophys. Acta, **649**, 325 (1981).
36. D. MARSH, A. WATTS, P. J. BARANTES, Biochim. Biophys. Acta, **645**, 97 (1981).
37. M. KOMOROWSKA, M. KOTER, G. BARTOSZ, J. GOMULKIEWICZ, Biochim. Biophys. Acta, **686**, 94 (1982).
38. E. BERTOLI, M. MASSERINI, S. SONNINO, R. GHIDONI. B. CESTARO, G. TETTAMANTI, Biochim. Biophys. Acta, **467**, 197 (1981).
39. H. M. McCONNELL, Biochim. Biophys. Acta, **219**, 415 (1970).
40. C. C. CURTAIN, F. D. LOONEY, Biochem. J., **213**, 131 (1983).
41. K. W. BUTLER, I. C. P. SMITH, H. SCHNEIDER, Biochim. Biophys. Acta, **219**, 514 (1970).
42. M. G. TAYLOR, I. C. P. SMITH, Biochim. Biophys. Acta, **599**, 140 (1980).
43. R. POON, L. M. RICHARDS, W. R. CLARK, Biochim. Biophys. Acta, **649**, 58 (1981).
44. D. L. WILLIAM—SMITH, S. J. WYARD, *Electron Spin Resonance in Medical Chemistry*, în *Progress in Medical Chemistry*, vol. 12, sub red. G. P. ELLIS, G. B. WEST, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, 1975.
45. M. EHRSTRÖM, M. HARMS-RINGDAHL, C. ALLING, Biochim. Biophys. Acta, **644**, 175 (1981).
46. J. A. RUTKEY, A. M. SPIELVOGEL, C. S. DUNLAP, R. D. SAUERHEBER, A. W. NORMAN, Biochim. Biophys. Acta, **688**, 177 (1982).
47. A. WATS, J. DAVOUST, D. MARSH, P. F. DEVAUX, Biochim. Biophys. Acta, **643**, 673 (1981).
48. D. MARSH, *Trends in Biochemical Sciences*, **88**, 330 (1983).
49. Ð. MARSH, A. WATS, F. J. BARRANTES, Biochim. Biophys. Acta, **645**, 97 (1981).

50. G. BARTOSZ, Biochim. Biophys. Acta, **664**, 69 (1981).
51. Y. TAKEUCHI, S. I. OHNISHI, M. ISHINAGA, M. KITO, Biochim. Biophys. Acta, **646**, 119 (1981).
52. S. E. JANSSON, J. GRIPENBERG, R. KERALI, C. G. GAHMBERG, Biochem. J., **195**, 123 (1981).
53. A. ROUSSELET, J. CARTAUD, P. F. DEVAUX, Biochim. Biophys. Acta, **648**, 169 (1981).
54. T. R. HESKETH, G. A. SMITH, M. D. HOUSLAY, N. A. BIRDSALL, N. J. M. METCALFE, G. B. WARREN, Biochemistry, **15**, 4145, (1976).
55. C. HIDALGO, D. D. THOMAS, N. IKEMOTO, J. Biol. Chem., **253**, 6879 (1978).
56. D. F. O'BRIEN, L. F. COSTA, R. A. OTT, Biochemistry, **16**, 1295 (1977).
57. Y. A. ISAACSON, P. W. DEROO, A. F. ROSENTAL. R. BITTMAN, J. O. McINTYRE, H. G. BOCK, P. GAZZOTI, S. FLEISCHER, J. Biol. Chem. **254**, 117 (1979).
58. N. C. ROBINSON, F. STREY, L. TALBERT, Biochemistry, **19**. 3656 (1980).
59. P. C. JOST, O. H. GRIFFITH, R. CAPALDI, G. VANDERKOOI, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **70**, 480 (1973).
60. P. F. KNOWLES, A. WATS, D. MARSH, Biochemistry, **18**, 4480 (1979).
61. A. WATS, I. D. VOLOTVSKI, R. D. PATES, D. MARSH, Biophys. J., **37**, 94 (1982).
62. D. MARSH, A. WATS, P. F. KNOWLES, Biochemistry, **15**, 3570 (1976).
63. S. A. MUPHREE, D. MURPHY, A. C. SARTORELLI, T. E. TRITTON, Biochim. Biophys. Acta, **691**, 97 (1982).
64. E. S. COPELAND, M. E. BOYKIN,, Biophys. J., **15**, 1125 (1975).
65. J. POLONOVSKI, Biochem. J., **221**. 659 (1984).
66. M. K. JOHNSON, A. J. THOMPSON, T. A. WALSH, D. BARBER, C. GREENWOOD, Biochem. J., **189**, 285 (1980).
67. K. F. SCHNELL, W. ELBE, H. KÄSBAUER, Biochim. Biophys. Acta, **732**, 266 (1983).
68. P. R. BLANQUET, Biochem. J., **213**, 479 (1983).
69. F. GIRAUD, M. CLARET, K. R. BRUKCDORFER, B. CHAILLEY, Biochim. Biophys. Acta, **647**, 249 (1981).
70. M. ESMANN, Biochim. Biophys. Acta, **688**, 251 (1982).
71. M. ESMANN, Biochim. Biophys. Acta, **414**, 260 (1982).
72. R. J. MEHLHORN, L. PACKER, Ann. N. Y. Acad. Sci., **414**, 180 (1983).

C. ZARNEA, *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, Edit. Academiei, București, 1984, 474 pagini, 246 figuri, 64 planșe

Recenta apariție a volumului II din amplul „Tratat de microbiologie generală" constituie un eveniment științific de prestigiu, apreciat ca atare prin interesul notoriu cu care a fost așteptată și primită această apariție. Ca și primul, cel de-al doilea volum din tratatul menționat este elaborat într-o concepție originală și viziune modernă, atestînd erudiția recunoscută și prestigioasă personalitate științifică a autorului.

Lucrare monografică de referință, volumul II include cele mai recente achiziții științifice, concepte, ipoteze și teorii, avînd ca demers principiul că știința, în general, este constituită nu numai din fapte experimentale, ci și din idei demonstrate prin fapte; concepția de elaborare a lucrării îi conferă astfel o pertinentă valoare euristică.

Ca structură, conținutul volumului II este constituit din următoarele patru părți: *Fiziologia microorganismelor, Creșterea și multiplicarea bacteriilor, Principii de sistematică și taxonomie a microorganismelor, Originea și evoluția microorganismelor.*

O pondere deosebită în economia volumului o deține problematica primei părți referitoare la procesele biochimice și energetice ale metabolismului microorganismelor, precum și la principalele tipuri de metabolism caracteristice anumitor microorganisme. Conceptual, această problematică este analizată și tratată în contextul celor mai recente date și interpretări acreditate, sub aspectul bazelor moleculare ale diferitelor căi metabolice (catabolice, anabolice, amfibolice, anaplerotice) și ale mecanismelor de producere, conservare și transfer de bioenergie. O asemenea abordare își justifică pe deplin importanța și semnificația nu numai pentru biologia microorganismelor, ci și pentru biochimie în general, „design"-ul molecular al repertoriului metabolic la organismele superioare fiind identic sau analog cu cel al microorganismelor.

În partea a doua a volumului sînt prezentate, într-o reușită sinteză, date științifice — multe cu caracter de noutate — privind creșterea și multiplicarea bacteriilor, dinamica multiplicării bacteriilor în culturi, factorii care influențează creșterea microorganismelor, măsurarea populației bacteriene, culturile sincrone și continue, supraviețuirea și moartea bacteriilor.

Partea a treia a volumului, consacrată principiilor de sistematică și taxonomie a microorganismelor, se remarcă, de asemenea, printr-o tratare și interpretare modernă, la nivel molecular, a problematicii respective. Menționăm astfel abordarea genetică și moleculară în taxonomie, bazele chimice ale filogeniei moleculare, semnificația taxonomică a transferului de material genetic și a recombinării genetice, stabilirea relațiilor de înrudire între specii și a filiației lor evolutive cu ajutorul ARNr etc. În context, sînt prezentate și o serie de aspecte noi referitoare la taxonomia numerică, normele generale de nomenclatură la bacterii, sistemele de clasificare și criteriile de identitate a bacteriilor, colecțiile de culturi.

O abordare la nivel molecular se remarcă și în cadrul ultimei părți a volumului, în care se prezintă originea și evoluția microorganismelor. În contextul unei argumentate analize comparative a diferitelor ipoteze privind perioada evoluției chimice și prebiologice, se prezintă date referitoare la apariția informației biologice, rspectiv la caracterul primordial al ADN și ARN. Se expun, totodată, principiile esențiale ale apariției primelor organisme vii, ale fotosintezei, caracterul primordial al celulelor procariote, precum și diferitele ipoteze formulate în legătură cu apariția celulelor eucariote, evidențiindu-se gradul lor de semnificație teoretică și operațională. În final, este prezentată importanța descoperirii archebacteriilor pentru biologia și sistematica bacteriilor, ca și pentru biologia generală.

Conținutul volumului își găsește un solid suport științific în ampla bibliografie selectivă, care include cele mai recente progrese în domeniul respectiv, predominînd surse originale și de sinteză selectate, analizate și interpretate cu discernămînt într-o concepție originală.

Fondul valoros și nivelul științific ale lucrării sînt asigurate și printr-o bogată ilustrație, reprezentată prin 246 figuri, 43 tabele și 64 planșe, deosebit de sugestive, care argumentează și susțin exemplar datele științifice prezentate.

Totodată, este relevantă preocuparea autorului de a conferi întregului conținut al volumului un caracter analitic, deductiv și corelativ, asamblînd într-un mod unitar și cu o logică riguroasă noile progrese realizate în domeniul atît de fascinant și cu largi deschideri aplicative al microbiologiei.

Densitatea informației, reflectată într-o sinteză pe deplin reușită, sistematizarea și claritatea ideilor, stilul impecabil, cursiv și antrenant sînt calități care, alături de celelalte criterii de valoare, concură la ținuta de ansamblu a volumului.

St. cerc. biochim., 28, 2, 186–192 (1985)

Într-adevăr, acest volum se înscrie ca o contribuție originală remarcabilă în literatura de specialitate, fiind de o certă valoare științifică și documentară pentru specialiștii din domeniul microbiologiei și din domenii conexe. Parafrazînd unul din citatele cu semnificație de aforism înscrise pe supracoperta volumului, citat aparținînd reputatului om de știință M. Veron, considerăm că este o datorie și o obiectivă recunoaștere să apreciem acest volum și implicit întregul „Tratat de microbiologie generală" ca o „operă de progres pentru toți biologii".

Mihai Șerban

H. FRUNDER, *Physiologische Chemie. Ein Arbeitsbuch für Medizinstudenten in der vorklinischen Ausbildung* (Chimie fiziologică. Un manual de lucru pentru studenții în medicină în pregătirea preclinică), VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1984, 400 pagini, 132 figuri, 11 tabele

Acest manual, conceput într-o formă foarte originală, se adresează, după cum spune și subtitlul, studenților în medicină. Autorul renunță în mod conștient la prezentarea unor principii de bază ale biofizicii, chimiei și biologiei și aprofundează mai ales acele procese biochimice fundamentale care sînt strîns legate de clinică. Astfel, pentru a sublinia importanța și funcția acestor procese fundamentale, ele sînt integrate, după descrierea lor analitică, în prezentarea proceselor metabolice ce au loc în organismul uman în stare normală sau patologică, contribuind în felul acesta la o mai bună înțelegere a legăturilor complexe existente.

Fiecare din cele douăsprezece capitole începe cu un scurt cuprins al aspectelor tratate și se încheie cu o parte deosebit de utilă, consacrată atît unor exerciții inspirate, de regulă, din cazuri reale întîlnite în clinică, cît și unor întrebări recapitulative, ale căror răspunsuri pot fi doar da sau nu. Autorul acordă o mare atenție acestor exerciții și întrebări și recomandă studenților care întîmpină greutăți în rezolvarea lor recitirea cu atenție a materialului prezentat în capitolul respectiv, înainte ca ei să apeleze la răspunsurile date tot de autor.

Manualul este scris într-o formă concisă, inteligibilă, bine sistematizată și la un înalt nivel științific. Numeroasele reprezentări schematizate, formulele structurale, reacțiile chimice și tabelele sinoptice, alese cu mult discernămînt, vin în sprijinul unei mai bune înțelegeri și al unei asimilări mai ușoare a celor prezentate.

Un index alfabetic suprinzător de vast completează în mod fericit și cu mult folos acest manual, scos în condiții grafice foarte îngrijite, care poate fi recomandat cu deosebită căldură nu numai studenților în medicină, dar și tuturor celor care studiază biochimia la facultățile de biologie și chimie și în egală măsură și cadrelor didactice și tinerilor cercetători din institutele de profil.

Horst D. Schell

H. GRIMM, R.-D. REICKNAGEL, *Grundkurs Biostatistik* (Noțiuni de bază ale biostatisticii) VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1985, 153 pagini, 35 figuri, 31 tabele

Această introducere succintă în biostatistică se bazează pe materialele prezentate la cursurile de introducere în biostatistică, ținute în fața studenților de biologie din anul II, precum și pe cele prezentate la cursurile postuniversitare ale biologilor. Volumul face parte din seria de studii consacrate științelor biologice, apărută în Editura Gustav Fischer din Jena.

Este un adevăr unanim recunoscut că orice biolog care lucrează cu aspecte cantitative ale biologiei apelează, pentru interpretarea datelor sale experimentale, la metode matematice, dintre care amintim mai ales calculul probabilităților și statistica matematică. Aceste două discipline sînt unificate în noțiunea de biometrie, care indică aplicarea lor specială în științele biologice.

Neputînd aborda, desigur, în această scurtă introducere în mod detaliat întregul aparat matematic, autorii se referă doar la metodele biometrice esențiale și tipice.

Cele treisprezece capitole ale prezentului volum sînt scrise într-un limbaj concis. Textul este însoțit de numeroase figuri și tabele, care sînt de mare ajutor pentru cititor. După o scurtă introducere, autorii tratează pe rînd aspecte legate de planificarea experiențelor, apoi elementele calculului probabilității, aprecierea parametrilor, intervalele de confidență, modelele stochastice, verificarea ipotezelor, analiza simplă a variantelor, regresia și corelația, interdependența caracteristicilor calitative, aprecierea frecvenței și a procentajelor și procedeele aparametrice. Un ultim capitol este consacrat unei serii de probleme legate de subiectul tratat, cum ar fi regresia liniară multiplă, regresia neliniară, dozarea imunologică, analiza secvențială, relațiile cu teoria informațională și altele.

Prezenta introducere în biostatistică, care se adresează biologilor, medicilor și tuturor celor care aplică în activitatea lor metode biostatistice, mai cuprinde indicații bibliografice cu

lucrări valoroase de specialitate pentru cei care doresc să aprofundeze anumite aspecte tratate de autori și o anexă cu o serie de tabele statistice utile și se încheie cu un index alfabetic de subiecte.

Horst D. Schell

Pathobiochemie und Pathophysiologie des Kohlenhydratstoffwechsels unter besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus (Patobiochimia și patofiziologia metabolismului glucidic cu referiri speciale la diabetul zaharat), A. ZÜHLKE, H. BIBERGEIL, H. SEIPELT, VEB Verlag, Volk und Gesundheit, Berlin, 1984, 138 p., 50 figuri, 23 tabele.

Lucrarea, apărută prin contribuția a trei dintre cei mai valoroși diabetologi din R. D. Germană, reprezintă o monografie sintetică consacrată alterărilor biochimice și fiziologice ale metabolismului glucidic, generatoare ale sindromului de diabet zaharat. Ea conține în plus elemente moderne de diagnostic și tratament al maladiei, precum și evaluarea succintă a perspectivelor cercetării de specialitate.

Lucrarea cuprinde două părți distincte, axate pe biochimia și fiziologia glucidelor în organismul normal și, respectiv, în condiții patologice. În prima parte sînt prezentate noțiunile de bază în legătură cu structura hidraților de carbon, mecanismele reglării glicemiei, căile metabolismului glucozei, procesele glicogenolizei și glicogenogenezei. Alte subcapitole sînt consacrate enzimelor specifice metabolismului glucidelor și cineticii lor, eredității și mecanismelor de acțiune ale hormonilor glicoreglatori. Cea de-a doua parte tratează clasificarea și etiopatogeneza diabetului zaharat, alterările metobilice specifice sindromului, metodele de diagnostic și de control, terapia maladiei. În continuare, în cadrul unor subcapitole separate sînt prezentate o serie de date recente referitoare la modificările gluconeogenezei și ale metabolismului fructozei și galactozei apărute în diabet, alterările metabolice în sindromul de malabsorbție, modificările metabolismului glucidic în hematii etc. Toate aspectele enumerate contribuie la formarea unei imagini de ansamblu asupra complexității mecanismelor metabolice care stau la baza distrofiilor de glicoreglare și în primul rînd a diabetului zaharat.

Cartea se constituie într-un îndreptar util adresat atît specialiștilor (medici umani, biochimiști, biologi), cît și studenților care doresc să se instruiască în domeniul patobiochimiei diabetului zaharat. Lucrarea este însoțită de o ilustrație bogată, care contribuie în mare măsură la înțelegerea problematicii prezentate, iar bibliografia în general recentă, amplifică valoarea documentară a cărții.

Tiberiu Trandaburu

C. C. SCHNORRENBERGER, *Die topographisch-anatomischen Grundlagen der chinesischen Akupunktur und Ohrakupunktur. Drei Wandtafeln mit begleitendem Text für die Praxis.* (Bazele topografo-anatomice ale acupuncturii chineze și acupuncturii urechii. Trei planșe de perete cu text însoțitor pentru practică), ed. a 3-a, Hippokrates, Stuttgart, 1983, 160 pagini.

Datorită unei extinderi tot mai largi a metodelor chineze de acupunctură și moxaterapie în aproape toate domeniile practicii medicale, a devenit necesară o a treia ediție a prezentei lucrări, care este un îndrumător prețios și de nelipsit atît pentru începători, cît și pentru cei avansați în aceste tehnici, permițînd o orientare rapidă și sigură asupra localizării, indicației și denumirii punctelor folosite în acupunctură, precum și asupra tehnicii de urmat în aplicarea tratamentului. Materialul, scris de un reputat specialist în domeniu, absolvent al unor cursuri de perfecționare din China și cu mai multe deplasări profesionale în această țară, este însoțit de trei planșe cuprinzînd toate punctele corpului și ale urechii (770 puncte) folosite astăzi în acupunctură și în moxaterapia chineză și care, înțepate în mod corect, pot duce la efecte terapeutice favorabile la omul bolnav. Astfel, aceste tabele conțin 361 de puncte ale celor 14 meridiane clasice, 171 de puncte suplimentare situate în afara sistemului meridianelor, 110 puncte noi, depistate abia în ultimii ani de institute de cercetare din China, 110 puncte de la nivelul pavilionului urechii, precum și 18 puncte deosebite situate la nivelul mîinii.

După o parte consacrată prefețelor, capitolul 2 al cărții conține informații cu privire la folosirea planșelor și găsirea punctelor. În capitolul 3, cel mai amplu dezvoltat, sînt prezentate pentru fiecare punct în parte topografia sa anatomică exactă, indicația medicală și tehnica de înțepare sau ardere după cunoștințele cele mai recente. Capitolul 4 conține un index alfabetic pentru fiecare boală sau perturbare fiziologică amintită în text și pentru fiecare punct Shu (Shu-xue). Un ultim capitol cuprinde indicațiile bibliografice și observații. Demn de reținut, ca încheiere, ni s-a părut avertismentul autorului adresat tuturor celor care practică acupunctura sau moxaterapia, subliniind că materialul prezentat, oricît de complet ar fi el, nu este su-

ficient pentru o executare corectă a acestor tehnici. Pentru aceasta mai sînt necesare cunoștințe aprofundate din medicina chineză, o pregătire medicală temeinică, studiul operelor fundamentale ale acupuncturii clasice și o experiență practică corespunzătoare.

Horst D. Schell

PETER FRIEDRICH, *Supramolecular enzyme organization* (Organizarea supramoleculară a enzimei), Pergamon Press, Oxford, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1984, 300 pagini, 91 figuri, 18 tabele.

Numeroase cercetări din enzimologia clasică au avut drept scop separarea enzimelor și determinarea structurii și a funcției acestora. În acest sens, lucrarea de față constituie o adevărată monografie asupra a ceea ce s-a realizat pînă în prezent în domeniul organizării structurale a enzimelor.

Materialul, selectiv prezentat, este structurat în nouă capitole. În primele două capitole sînt prezentate într-o manieră succintă noțiunile de bază referitoare la interacțiunea proteină-proteină, precum și terminologia utilizată în acest domeniu. Astfel, structura cuaternară și cele mai multe forme de orgnizare supramoleculară au ca trăsătură comună faptul că se bazează pe interacțiunea proteină-proteină, „mesajele" fiind transmise prin intermediul unor suprafețe de contact. Aceste transmisii se realizează în urma unor mișcări moleculare recunoscute ca schimbări conformaționale. Din acest punct de vedere nu ar exista în principiu diferențe între interacțiunea enzimă-enzimă în cadrul unui complex, interacțiunea între subunități dintr-un oligomer și chiar interacțiunea domeniilor structurale ale unei enzime monomere.

Capitolul 3 prezintă detaliat și cu competență structura cuaternară a enzimelor cu toate aspectele pe care le comportă această problemă : proteine oligomere și rolul biologic al acestora prin prisma stabilității și reglării activității enzimelor ; metode de determinare a simetriei proteinelor oligomere ; complexe enzimatice (privite de autor în ansamblu ca enzime allosterice).

Capitolul 4 tratează problema sistemelor multienzimatice, care posedă un grad net superior de organizare. Astfel, se pot distinge două nivele de organizare : unul pur funcțional și altul structural-funcțional. Autorul insistă de fapt asupra orgnaizării structurale, care presupune toate tipurile de asocieri existente „in vivo" ce implică participarea enzimelor.

Numeroase cercetări au fost consacrate studierii pe larg a complexelor și a conjugatelor multienzimatice (capitolul 5, unele dintre acestea constituind chiar subiectul unor monografii. Ele aparțin unui nivel supramolecular de organizare, constînd din două sau mai multe enzime cu activități catalitice diferite asociate covalent (conjugate) sau necovalent (complexe).

Asocierea enzimelor cu diferite structuri celulare, precum și posibilitatea desprinderii lor de pe acestea sînt riguros descrise și exemplificate în capitolul 6.

Compartimentarea constituie unul din principiile fundamentale ale organizării materiei vii. În acest sens, capitolul 7 oferă un spațiu larg problemei compartimentării metaboliților, deschizînd perspective noi de cercetare.

În penultimul capitol, autorul descrie pe scurt o serie de aspecte legate de modelarea matematică a sistemelor enzimatice și de studiul enzimelor „in vivo".

Ultimul capitol este dedicat posibilităților de aplicare a enzimelor și perspectivelor de dezvoltare a cercetărilor în domeniul enzimologiei.

Prezenta monografie are la bază o bibliografie deosebit de amplă, iar ilustrația grafică este foarte sugestivă. În plus, lucrarea cuprinde un index de subiecte, care permite o mai bună valorificare a materialului expus.

Sîntem convinși că lucrarea se va bucura de o largă apreciere, rămînînd pentru mult timp o lucrare de referință în domeniul structurii enzimelor.

Ofelia Gozia

R. OVCAROV, M. NICOLOVA, I. BANTUTOVA, R. NICOLOV, S. SAEV, *Der Schenerz und seine pharmakologische Beeinflussung* (Durerea și influențarea sa farmacologică), VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1985, 164 pagini.

Cartea autorilor din R. P. Bulgaria, tradusă în limba germană de dr. Winifred Krause, cuprinde o vedere de ansamblu asupra medicamentelor analgezice, substanțe care înlătură, calmează sau împiedică apariția durerii. Durerea este, pentru organismele animale superioare, una din funcțiile cele mai importante de apărare, un semnal pentru apariția unor modificări periculoase provenite din interior sau exterior. Cu toate cercetările efectuate, nu sînt încă pe deplin clarificate bazele reale ale rolului durerii, legătura cauzală dintre originea și existența ei, fapt ce a determinat combaterea simptomatică a acesteia prin analgezice.

Autorii acestei monografii păstrează în discutarea materialului împărțirea clasică : *analgezice nenarcotice* (antipiretice, antiinflamatoare, antitermice nesteroide), care acționează

asupra segmentelor nervoase periferice, și *analgezice narcotice*, care acționează asupra sistemului nervos central și nu au acțiune antiinflamatoare.

Cartea cuprinde patru capitole, dintre care primul, intitulat „Farmacoterapia durerii", cuprinde definițiile celor două clase de analgezice, urmînd apoi expunerea pe larg a problemelor legate de fiecare medicament în parte. Autorii remarcă importanța deosebită a rolului prostaglandinelor în elucidarea mecanismului de acțiune al analgezicelor/antipiretice, ca urmare a constatării inhibitorii prostaglandin-sintetazei de către acidul antilosalicilic (1971). S-a stabilit că prostaglandinele și alți derivați ai acidului arahidonic au un rol important în declanșarea durerii și participă la apariția proceselor inflamatorii și alergice, fiind eliberate în organism alături de alți mediatori (bradikinina, histidina, serotonina). În continuare sînt expuse principalele teorii asupra mecanismului de acțiune al analgezicelor/antiinflamatorii ; se discută patogeneza proceselor reumatice, la care contribuie unele reacții imunologice, acțiunea antipiretică și rolul hipotalamusului în bilanțul termic al organismului. Alături de proprietățile farmacologice ale fiecărei clase de substanțe, sînt prezentate și alte aspecte legate de întrebuințarea acestora, ca potențarea activității cu alte substanțe, acțiuni secundare și farmacocinetice.

În legătură cu analgezicele narcotice morfină și derivații săi, produși similari de sinteză sau semisinteză, se discută mai ales aspectul toleranței și dependenței, apoi unii antagoniști ai narcoticelor.

În continuarea aceluiași capitol sînt prezentate alte clase de substanțe cu proprietăți analgezice : psihotrope și anestezice locale.

În capitolul 2 sînt prezentate rezultatele cercetărilor experimentale și clinice cu analgezice.

Capitolul 3 discută problema foarte importantă a dependenței medicamentoase, modele de punere în evidență a acesteia și stabilirea toleranței.

Ultimul capitol descrie metodele de determinare clinică și experimentală a efectului analgezic.

Cartea este completată cu o amplă bibliografie la zi și un index de subiecte.

Această vedere de ansamblu, documentată și competentă, a stadiului actual în domeniul medicamentelor analgezice este importantă atît pentru medicii practicieni, cît și pentru cercetătorii din domeniul medical.

Teodora Vâlsănescu

Nickel in the human Environment (Nichelul în mediul ambiant al omului), sub redacția F. W. SUNDERMAN, Jr., IARC Scientific Publications No. 53, International Agency For Research in Cancer, Lyon, 1984.

Acest volum conține lucrările susținute la simpozionul care a avut loc în 1983, la Lyon, cu ocazia aniversării a 100 de ani de la studiile de pionierat ale lui T.P.A. Stuart asupra toxicității nichelului.

Lucrările sînt grupate în următoarele capitole : „Epidemiologie", în care se studiază efectele complexe ale compușilor de nichel asupra muncitorilor care lucrează în acest domeniu ; „Carcinogenicitate", în care se descriu implicațiile oncogene ale compușilor de nichel asupra animalelor de laborator : „Metabolism și toxicologie", în care sînt urmărite transformarea, concentrarea și eliminarea compușilor de nichel pătrunși în organism prin respirație, dietă sau prin injectare ; „Expunere umană", în care se discută căile și modul în care compușii de nichel pot pătrunde în organismul uman.

Cartea este utilă în primul rînd cercetătorilor și practicienilor igieniști, toxicologilor și specialiștilor în protecția mediului înconjurător.

C.-C. Prunescu

Models, Mechanisms and Etiology of Tumour Promotion (Modele, mecanisme și etiologia apariției tumorilor), sub redacția M. BÖRZSÖNYI, N.E. DAY, K. LAPIS, H. YAMASAKI, IARC Scientific Publications No. 56, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1984.

Cartea de față cuprinde „in extenso" lucrările prezentate la cel de-al IV-lea Simpozion internațional asupra substanțelor cancerigene și asupra factorilor care contribuie la apariția tumorilor canceroase la om și în condiții experimentale. Simpozionul a avut loc la Budapesta în zilele de 16—18 mai 1983.

Lucrările sînt grupate pe capitole astfel : „Modele și mecanisme ale inițierii tumorilor de piele" (2 lucrări) ; „Modele și mecanisme ale inițierii tumorilor de ficat" (9 lucrări) ; „Interacțiuni de membrană ale promotorilor tumorali" (4 lucrări) ; „Răspunsul celular la agenții inițiatori ai

tumorilor" (6 lucrări); „Interacțiunea inițiatorilor tumorali cu genomul gazdei, virusuri și sistemul imun" (4 lucrări); „Modele ale carcinogenezei în trepte multistadiale, în epidemiologie" (4 lucrări); „Modele experimentale pentru studiul factorilor etiologici în carcinogeneza multistadială" (3 lucrări); „Etiologia carcinogenezei multistadiale umane" (4 lucrări); „Inhibarea apariției tumorilor" (o lucrare); „Concluzii și perspective" (o lucrare).

Cartea, care are o frumoasă condiție grafică și cuprinde lucrări de mare valoare experimentală și interpretativă, se încheie cu un index de autori și un index de subiecte. Fiecare lucrare are și o bibliografie corespunzătoare.

Această carte este utilă medicilor oncologi, cercetătorilor în oncologia experimentală, biochimiștilor și biofizicienilor interesați în mecanismele fine ale inițierii experimentale a neoplasmelor, precum și în mecanismele inhibitorii ale acestor neoplazii.

C.-C. *Prunescu*

N-nitroso compounds: occurrence, biological effects and relevance to human cancer (Compușii N-nitrozo: apariție, efecte biologice și semnificație în cancerul uman,) sub redacția I. K. O'NEILL, R. C. Von BORSTEL, C. T. MILLER, V. LONG, H. BARTSCH, IARC *Scientific Publications* No. 57, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1984, 1011 pagini.

Volumul de față cuprinde lucrările prezentate la al VIII-lea Simpozion internațional asupra compușilor N-nitrozo, ținut între 5 și 9 septembrie 1983 la Bouff (Canada). Simpozionul a fost consacrat în întregime acestor compuși și precursorilor lor, substanțe care, datorită acțiunii lor cancerigene, au constituit subiectul numeroaselor publicații ale seriei de față. Se motivează aceasta prin larga răspîndire a compușilor N-nitrozo în mediul înconjurător și prin formarea lor endogenă la om din constituenți nutritivi. Deși se știa că aceste substanțe sînt cancerigene pentru animale, nu fusese încă dovedită acțiunea lor în acest sens și în cazul omului. La acest simpozion s-au prezentat date epidemiologice care sugerează legătura dintre N-nitrozaminele din fumul de țigară și cancerul gurii la om, scoțîndu-se în același timp în evidență posibilitatea apariției și a altor tipuri de cancer.

Datorită largii răspîndiri a compușilor N-nitrozo s-au manifestat vădite preocupări în ceea ce privește identificarea în mediul înconjurător a surselor nocive, precum și căutarea mijloacelor de a preveni expunerea omului la ele.

După o prezentare generală a compușilor N-nitrozo din punct de vedere al răspîndirii, efectelor biologice și semnificației în cancerul uman, volumul cuprinde lucrările simpozionului structurate pe următoarele capitole: Apariția în mediul înconjurător a compușilor N-nitrozo și a precursorilor; Noi compuși N-nitrozo și metode adecvate de analiză; Formarea endogenă a compușilor N-nitrozo; Formarea compușilor N-nitrozo; Cataliză, inhibiție, mecanisme; Distrugerea compușilor N-nitrozo în laborator ca măsură de precauție; Modificările metabolismului și cancerigenității compușilor N-nitrozo; Refacerea ADN și detectarea macromoleculelor alkilate; Efecte biologice: cancerigene și mutagene; Efectele cancerigene ale tutunului; Studii epidemiologice și studii de laborator combinate.

Studiile făcute pînă în prezent nu au stabilit cu exactitate rolul N-nitrozaminelor în provocarea cancerului uman, dar, așa cum se arată și în încheiere, volumul acesta reprezintă un material bogat în informații interesante, cu un merit deosebit pentru continuarea cercetărilor în domeniu.

Mihaela Trif

Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 114, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York — Tokio, 1985, 255 pagini.

Concepută ca o colecție de cinci lucrări cu caracter de referate generale, cartea prezintă cîteva aspecte ale cercetărilor recente din domeniul microbiologiei.

Prima lucrare, referitoare la relațiile existente între archaebacterii și originea citoplasmei eucariote, analizează din multiple puncte de vedere aceste relații. Autorul aduce argumente pentru faptul că strămoșii citoplasmei eucariote au avut asemănări cu archaebacteriile sulfdependente actuale.

A doua lucrare se referă la ADN-topoizomeraze, enzimele care controlează conformația ADN. Sînt descrise clasele principale ale acestei enzime (tip I, tip II, mitocondriale, virale, de recombinare), un accent deosebit acordîndu-se funcțiilor biologice complexe ale acesteia.

A treia lucrare abordează problema particulelor de ARN cu interferență defectivă (DI) din virusul influenței, reprezentînd un rezumat al cunoștințelor curente despre particulele DI

ale influenței. O atenție deosebită se acordă originii, structurii și expresiei genomului DI, ca și rolului posibil al acestor particule DI în evoluția virusului și a bolii.

A patra lucrare reprezintă un studiu larg privind biochimia arenavirusurilor. Acest tip de virusuri prezintă un interes deosebit datorită, pe de o parte, bolilor grave, uneori fatale, pentru om, ca, de exemplu, coriomeningita limfocitică, și, pe de altă parte, proprietății lor unice de a conține frecvent ribozomi și specii de ARN mici (4—5,5 S), alături de specii genomice de ARN.

Ultima lucrare tratează unele probleme privind neuraminidaza virusului influenței. Sînt prezentate rezultatele unor studii recente referitoare la structura primară și tridimensională a acestei enzime, fiind discutate legăturile posibile dintre caracteristicile structurale și variația antigenică a influenței.

Cartea se remarcă nu numai prin valoarea științifică ridicată a lucrărilor ce o alcătuiesc, ci și prin prezentarea grafică impecabilă.

V. Ostafe

Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 115 : *Human T-Cell Leukemia Virus* (Virusul leucemic al celulelor T umane), P.K. VOGT, Springer-Verlag, Berlin, 1985, 266 pagini.

Acest volum se referă la virusurile leucemice ale celulelor T umane, un grup de agenți patogeni umani de foarte mare interes. Lucrările din ultimii ani au arătat că problemele importante care trebuie abordate în acest domeniu sînt : elucidarea funcției regiunii pX, cunoașterea receptorilor celulari și a mecanismului patogenezei acestor virusuri. În cartea de față sînt strînse laolaltă informațiile esențiale asupra acestui grup de virusuri, care reprezintă primul retrovirus uman și agentul cauzal al leucemiei celulelor T adulte. Cele 16 capitole ale cărții acoperă întreg spectrul virusului leucemic al celulelor T umane, începînd cu descoperirea virusului și epidemiologia caracteristică a infecției și bolii și terminînd cu clonarea moleculară și cartarea întregului genom viral.

Ștefana Mogoș

Advances in Anatomy, Embriology and Cell Biology, vol. 91 : *Morphogenesis of the Brain in Staged Rhesus Monkey Embryos* (Morfogeneza creierului la maimuța *Rhesus* în stadii embrionare), sub redacția AGNES A. M. GRIBNAU, L. G. M. GEIJSBERTS, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg—New York — Tokyo, 1985, 19 figuri, 69 pagini.

Lucrarea, foarte densă cuprinsă în acest volum, descrie detaliat morfogeneza creierului la embrionii maimuțelor *Rhesus* între stadiile 13 și 23, adică între 28 și 50 ± 1 zile de viață embrionară.

Pentru realizarea acestei cercetări s-au folosit tehnici simple, dar de mare acuratețe, între care enumerăm : fecundarea naturală realizată în timpul ovulației, tehnici de histologie clasică, fotografierea zonei cefalice la embrionii transparentizați cu metilbenzoat. Secțiunile seriate obținute pe material inclus în parafină au fost colorate cu hematoxilină-eozină sau cu o tehnică Nissl modificată. S-au realizat de asemenea reconstituiri tridimensionale ale creierului la unele stadii, pe foi de polistiren desenate și decupate.

Una din concluziile interesante ale acestei lucrări, care aduce numeroase date și precizări noi, este faptul că morfogeneza creierului în stadii timpurii este similară la rozătoare și primate și identică la *Rhesus* și la om.

Cartea este utilă pentru embriologii și anatomiștii mamiferelor, precum și pentru fiziologii și morfologii interesați în cercetări descriptive sau experimentale asupra creierului embrionar și anexelor sale.

C.-C. Prunescu

Voprosî biologhiceskoi i meditzinskoi tehniki, vol. VI, „Minerva", Tbilisi, 1984.

Cel de-al VI-lea volum cu lucrările Societății științifice republicane de tehnică biomedicală include articole consacrate noilor tehnici pentru cercetările de medicină biologică, folosirea metodelor automaticii și tehnicii de calcul pentru serviciul medical și automatizarea experimentului științific în diferite ramuri ale biologiei și medicinii.

Volumul prezintă interes pentru biologi și fizicieni, ca și pentru ingineri, matematicieni, tehnologi și alți specialiști care lucrează în domeniul metodologiei biomedicale și construirii de instrumente.

Haralambie Țițu

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale de nivel științific superior din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viața științifică*, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștință cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., *Recenzii*, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : 78200 — București, 2, P.O.B. 2—2.

ÎN EDITURA ACADEMIEI A APĂRUT:

Seria **Probleme globale ale omenirii**
coordonator: MIHAI DRĂGĂNESCU

Volumul **Revoluția biologică**
coordonator: G. ZARNEA

Volumul, reunind lucrările prezentate la Sesiunea științifică „Revoluția biologică", organizată de Comisia de prognoză a Academiei Republicii Socialiste România în toamna anului 1983, dezbate probleme privind contextul istoric al revoluției biologice și biochimice, perspectiva revoluției bioindustriale, cunoașterea și modelarea în biochimie, relațiile dintre ordinea taxonomică și organizarea sistemică a materiei vii, agroecologia și viitorul agriculturii, calitatea biologică și metodele ei de testare, prognoza ecologică, biofizica membranelor, tehnologia ADN recombinant, relațiile funcționale ale celulei cu informația genetică etc.

1985 DEC 13

RM – ISSN 0049 – 2396

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 28, NR. 2, P. 101 – 192, BUCUREȘTI
IULIE – DECEMBRIE 1985

I. P. Informația c. 1582

43 816

Lei 30